

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Sirli Luup

**Kataboliitne repressioon *Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 virulentsuses**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Lee Põllumaa

PhD Andres Mäe

TARTU 2015

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Märkmädanikku põhjustavad bakterid.....	6
1.2. <i>Pectobacterium wasabiae</i> .....	6
1.4. <i>Pectobacterium wasabiae</i> virulentsusfaktorid.....	8
1.4.1. Pektinaasid .....	8
1.4.2. Tsellulaasid .....	9
1.4.3. Proteaasid.....	10
1.4.4. Liikuvus .....	10
1.5. Virulentsusfaktorite regulatsioon.....	10
1.2.1. KdgR.....	11
1.2.2. Hulgatunnetus .....	11
1.2.3. Rsm süsteem .....	12
1.3. CRP ja kataboliitne repressioon.....	13
1.4. Rakusisene energiatase .....	14
1.4.1. ppGpp .....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.1. Materjalid ja meetodika .....	17
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid .....	17
2.2.2. Söötmel ja kasvatamine .....	18
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) .....	18
2.2.4. DNA geelelektroforees .....	19
2.2.5. Elektroporatsioon.....	19
2.2.6. $\beta$ -glükuronidaasi aktiivsuse määramine .....	19

2.2.7. Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsuse määramine tardsöötmel .....	20
2.2.8. Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsuse määramine vedelsöötmes .....	20
2.2.9. Rakusisese energiataseme mõõtmine .....	21
2.3. Tulemused ja arutelu.....	23
2.3.1. PCWDE-de transkriptsiooni efektiivsus .....	23
2.3.2. PCWDE-de tootmine vedelsöötmes .....	25
2.3.3. PCWDE-de tootmine tardsöötmetassidel .....	26
2.3.4. cAMP mõju PCWDE-de tootmisele .....	29
2.3.5. Rakusisene energiatase .....	32
2.3.6. Järeldused .....	33
KOKKUVÕTE .....	34
SUMMARY .....	35
KASUTATUD KIRJANDUS .....	36
LIHTLITSENTS.....	45

## KASUTATUD LÜHENDID

AHL – atsüül-homoseriin laktoon

Amp – ampitsilliin

cAMP – adenosiin-3',5'-monofosfaat

CAP - cAMP retseptorvalk (ingl. k. *cAMP receptor protein*)

Cel – tsellulaas

Cm – klooramfenikool

CMC – karboksümetüülselluloos

CRP – kataboliitne aktivaatorvalk (ingl. k. *catabolite activator protein*)

Csr – süsiniku kogumise regulaator (ingl. k. *carbon storage regulator*)

DKI – 5-keto-4-deoksüuronaat

DKII – 2,5-diketo-3-deoksüglükonaat

FlhDC – vibuti geenide ekspressiooni reguleeriv valkkompleks

Glc – glükoos

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafiat (ingl. k. *high-pressure liquid chromatography*)

KDG – 2-keto-3-deoksüglükonaat

LB – Luria-Bertani sööde

OD – optiline tihedus (ingl. k. *optical density*)

PCWDE – taime rakuseina lahundavad ensüümid (ingl. k. *plant cell wall degrading enzymes*)

Peh – endopolügalakturonaas

Pel – pektaatlüaas

PGA – polügalakturoonhape

PGTE – endopolügalakturonaat trans-eliminaas

Pme – pektiinmetüülesteras

Pnl – pektiinlüaas

PP – piimtass

Prt – proteaas

Pw – *Pectobacterium wasabiae*

QS – hulgatunnetus (ingl. k. *quorum sensing*)

Rsm – sekundaarsete metaboliitide regulaator (ingl. k. *regulator of secondary metabolites*)

SD – Shine-Dalgarno

X-gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiid

## SISSEJUHATUS

Igal aastal hävib suur osa põllumajanduslikust saagist erinevate taimehaiguste ja -kahjurite tõttu. Piiramaks saagi hävimist, tuleb tundma õppida taimehaigute põhjustajaid. Ühe olulise rühma taimehaiguste tekitajate hulgas moodustavad *Pectobacterium* perekonda kuuluvad bakterid. Üheks selliseks laialtlevinud fütopatogeenseks bakteriks on *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*), kes põhjustab nakatunud taimedel märgmädanikku. Tema põhiliseks peremeestaimeks Eestis on kartul, mis on oluline põllukultuur. Lisaks kartulile põhjustab see patogeen märgmädanikku ka mitmetel teistel juurviljadel nagu näiteks porgandil, kurgil, selleril ja paprikal.

*Pw* on oportunistlik patogeen, mis tähendab, et taime tungides suudab ta seal elada taimele märkamatuks ja alles sobivate keskkonnatingimuste tekkimisel ning populatsiooni arvukuse tõusul primaarses nakatumiskohas, käivitatakse virulentsusfaktorite massiline produktsioon. Tähtsaimad virulentsusfaktorid on rakuseina lagundavad ekstratsellulaarsed ensüümid, mille hulka kuuluvad pektinaasid, tsellulaasid ja proteaasid. Need ensüümid tagavad patogeeni varustamise täiendavate süsinikuallikatega, teiselt poolt aga aitavad maha suruda taimede kaitsevastuse käivitamise nakatunud taimel infektsiooni algstaadiumis, kui patogeeni arvukus nakatumiskohas on veel väike.

Peremeestaimel efektiivseks nakatamiseks ei piisa ainult virulentsusfaktorite massilisest produktsioonist, vaid see protsess peab olema ka väga täpselt reguleeritud, et virulentsusfaktorite süntees toimiks õigel ajal ja õiges kohas. Virulentsusfaktorite sünteesi kontrollivad mitmed regulaatorvalgud, mis koos moodustavad keerulise, mitmeastmelise regulatoorse võrgustiku, mis tagab virulentsusfaktorite koordineeritud produktsiooni infektsiooni erinevates etappides.

Inimese-, looma- ja taimepatogeenidel on üheks virulentsusfaktorite sünteesi reguleerivaks komponendiks CRP valgu vahendatud glükoosi kataboliitne repressioon.

Töö eesmärkideks oli välja selgitada, kas rakuseina lagundavate ensüümide tootmine allub kataboliitsele repressioonile, jälgida ekstratsellulaarsete ensüümide tootmist sõltuvalt söötme koostisest ning määrata rakusisene energiatase.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Märgmädanikku põhjustavad bakterid

Fütopatogeensed bakterid ehk taimepatogeensed bakterid põhjustavad nakatunud peremeestaimedel mitmesuguseid haigusi, näiteks märgmädanikku. Patogeeniga nakatumine võib toimuda juba taime kasvamisel põllul või ka hiljem saagi käsitlemisel ja hoiustamisel (Pérombelon ja Kelman, 1987). Põhilised märgmädanikku põhjustavad bakterid on perekonna *Pectobacterium* (varem nimetatud *Erwinia*) esindajad. Pektobakterite peremeesring on väga lai, hõlmates nii kultuurtaimi kui ka puu- ja juurvilju. Näiteks nakatavad nad kartulit, mis on nii Eestis kui ka mujal riikides suure majandusliku tähtsusega põllukultuur. Pektobakteritega nakatumine võib endaga kaasa tuua kartulisaagi osalise või täieliku hävimise (Pérombelon ja Kelman, 1980).

Pektobakterid kuuluvad oportunistlike patogeenide hulka, kes alles sobivate keskkonnatingimuste tekkimisel (madal hapniku kontsentratsioon, kõrge niiskus) käivitavad virulentsusfaktorite produktsiooni. Põhilisteks virulentsusfaktoriteks on neil rakuseina lagundavad ekstratsellulaarsed ensüümid (PCWDE; ing. k. *plant cell wall degrading enzymes*) ja liikuvus. PCWDE-de tootmine on kontrollitud mitmete omavahel seotud regulatsioonisüsteemide poolt (Pérombelon, 2002).

## 1.2. *Pectobacterium wasabiae*

Märgmädanikku põhjustavaid fütopatogeenseid baktereid õnnestus esmakordselt isoleerida nakatunud taimedest 20. sajandi alguses. Kõik märgmädanikku põhjustavad bakterid koondati perekonda *Erwinia* (Winslow *et al.*, 1920). Alles genoomuuringute käigus saadud 16S RNA järjestuste analüüsi tulemuste põhjal paigutati märgmädanikku põhjustavad *Erwinia*'d eraldi perekonda *Pectobacterium* (Hauben *et al.*, 1998). Pektobakterite perekonna moodustavad neli liiki: *P. atrosepticum* (*Pa*), *P. wasabiae* (*Pw*), *P. betavasculorum* (*Pb*) ja *P. carotovorum* (*Pc*), millest viimane jaguneb veel omakorda kolmeks alamliigiks (Moleleki, 2013).

Pektobakterid on pulgakujulised, gramnegatiivsed, fakultatiivsed anaeroobid. Nad ei moodusta spore. Liikumiseks kasutavad peritrihhaalselt paiknevaid vibureid (Pérombelon, 2002; Charkowsky, 2006).

Pektobaktereid peetakse üldiselt laia peremeesringiga patogeenideks, sest neid on isoleeritud mitmetelt taimeliikidelt ning paljud pektobakterite tüved on võimelised nakatama erinevaid peremeestaimi. Nimelt on nad võimelised nakatama erinevaid taimeliike rohkem kui 35% katteseemnetaimede seltsides (Ma *et al.*, 2007). Eranditeks on siinkohal *P. atrosepticum* ja *P.*

*betavascularum*, keda võib leida peaaegu üksnes vastavalt kartulilt ja suhkrupeedilt (Gardan, 2003). *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*) on laia peremeesringiga patogeen. Nimetatud patogeen on levinud nii parasvöötmes kui ka lähistroopilises kliimavöötmes (Toth *et al.*, 2003). Esmakordselt isoleeriti *Pw* Jaapanis mädarõikast (*Wasabia japonica*) (Goto ja Matsumoto, 1987), kuid ta on võimeline nakatama ka näiteks kartulit, porganit, sellerit, kurki, paprikat ja muid taimi.

*Pw* levib enamasti siis, kui külvamisel kasutatakse juba nakatunud seemnekartulit (Pérombelon ja Kelman, 1980). Leviku piiramiseks tuleb pisteliselt kontrollida seemnekartuleid, millel veel haigussümptomeid ei esine. Patogeeni esinemist mugulate pinnal tuvastatakse põhiliselt väljakülviga selektiivsõotmetele, PCR-iga või erinevate immunoloogiliste testidega (Czajkowski *et al.*, 2014). Lisaks nakatunud mugulatele võib *Pw* levida ka pinnaveega kastmisel, vihmaveega, bakterite liikumisel mullas olevas vees, külvivahendite või putukvektorite kaudu (Czajkowski *et al.*, 2011; Pérombelon ja Kelman, 1980).

*Pw* võib elada nii taime pinnal, taime sees kui ka mullas ja pinnavees. Taime pinnal ei ole kasvutingimused just kõige soodsamad ning patogeen ei pea seal kaua vastu. Küll aga taime tungides suudab ta apoplastis elada pikka aega latentses olekus taimele märkamatult, kuni infektsiooni etapi alustamiseks sobivate tingimuste tekkimiseni. Mullas ja pinnavees käitub *Pw* saprofütidina, toitudes teda ümbritsevast lagunevast lahustunud orgaanilisest materjalist (Toth *et al.*, 2003). Sõltuvalt keskkonnatingimustest suudab *Pw* mullas elus püsida kuni 6 kuud, kuid ta ei suuda mullas üle elada talve. Kõduneva taimse materjali leidumisel mullas suudab patogeen seal veelgi kauem eluvõimelisena säilida (Czajkowski *et al.*, 2011).

Taime nakatamiseks peab *Pw* tungima taime. Patogeen saab taime siseneda kas läbi taime pinnal olevate õhulõhede või vigastatud taimekoe. Vigastusi võivad põhjustada nii putukad kui ka inimese poolne käitlemine (Pérombelon ja Salmond, 1995). *Pw*-ga nakatumise järel võib eristada kahte infektsioonietappi. Esimene etapp on latentne faas, kus patogeen püsib taime apoplastis märkamatult, saades sealt kätte eluks ja paljunemiseks vajalikud toitained, rakuseina lagundavaid ensüüme ei toodeta ning haigussümptomeid taimel ei teki. See etapp võib kesta kuid, ulatudes ühest taimekasvuperioodist teise. Sel ajal saab ta eluks ja paljunemiseks vajalikud toitained kätte apoplastist. Bakteripopulatsiooni kasvades, kui toitained apoplastis ammenduvad, käivitatakse infektsiooni teine etapp (Pérombelon, 2002). Selles etapis hakatakse tootma suurtes kogustes taime rakuseina lagundavaid eksoensüüme, mis kahjustavad taime rakke. Nüüd kasutab patogeen toiduks nii lagundatud rakuseina

komponente kui ka kahjustatud rakkudest vabanevaid toitaineid (Toth *et al.*, 2003). Infektsiooni levikut soodustab nii vaba vee kättesaadavus taimes kui ka anaeroobne keskkond matsereerunud taimekoes (Burton ja Wigginton, 1970). Madal hapnikusisaldus halvab taime hapnikust sõltuvaid kaitsemehhanisme, ligniini tootmist ja vigastatud taimekoe paranemist (Pérombelon, 2002). Lisaks suurendab see ka raku membraani läbilaskvust, põhjustades rakusisu lekkimist ja toitainete vabanemist patogeeni (Pérombelon ja Salmond, 1995).

#### **1.4. *Pectobacterium wasabiae* virulentsusfaktorid**

*Pw* tähtsaimad virulentsusfaktorid on rakuseina lagundavad eksoensüümid (PCWDE) ning liikuvus. PCWDE-de alla kuuluvad pektinaasid, tsellulaasid ja proteaasid (Barras *et al.*, 1994). PCWDE-de sünteesi ei käivitata enne, kui bakteripopulatsiooni tihedus taimekoes on piisavalt suur. Lisaks indutseerivad taime rakuseina lagundavate ensüümide sünteesi ka mitmed kahjustatud taimerakkudest vabanevad signaalmolekulid, milleks on tavaliselt pektiini laguproduktid. Taime rakuseina lagundavate ensüümide indutseeritud süntees täidab kahte ülesannet: varustab kasvavat patogeeni populatsiooni toitainetega ja nõrgestab peremeestaime vastupanuvõimet patogeeni rünnakule (Toth *et al.*, 2003).

Taime tungides ei alusta patogeen kohe PCWDE-de tootmist, vaid kasutab kõigepealt toiduks taime apoplastis leiduvaid suhkruid ja aminohappeid. Suhkrutest on seal näiteks glükoosi, fruktoosi, sahharoosi, fruktaani ja muud (Livingston III ja Henson, 1998; Asis Jr *et al.*, 2003; Rico ja Preston, 2007). Eelistatult alustatakse tarbimist kõige paremini omastatavast suhkrust, milleks on glükoos. Alles glükoosi ammendumisel apoplastis korraldatakse ümber metabolismirajad ning hakatakse kasutama ka teisi suhkruid. Metabolismiradade ümberkorraldamisel on oluline osa kataboliitsel repressioonil (Ebright, 1993). Suhkrute ja aminohapete ammendumisel apoplastis tuleb edasiseks toidu kättesaamiseks hakata tootma PCWDE-sid. PCWDE-de suuremahuline produktsioon infektsiooni teises etapis on väga täpselt koordineeritud mitmete omavahel seotud regulatsioonisüsteemidega (Toth *et al.*, 2003).

##### **1.4.1. Pektinaasid**

Pektiini lagundavad ensüümid ehk pektinaasid on kõige tähtsamad märgmädanikku põhjustavad eksoensüümid. Pektiini on taime rakuseina üks olulisemaid komponente, mis koosneb omavahel  $\alpha$ -1,4-glükosiidsidemega seotud metüleeritud galakturoonhappe jääkidest. Pektiini lagundamine toob endaga kaasa kudede ja rakkude kahjustumise ning rakkude lekkimise (Barras *et al.*, 1994; Pérombelon, 2002). Pektinaasid jagunevad järgnevalt:



pektaatlüaas (Pel), pektiinlüaas (Pnl), pektiinmetüülesteras (Pme) ja polügalakturonaas (Peh) (Barras *et al.*, 1987). Pektaatlüaas ja pektiinlüaas lagundavad polügalakturoonhappe jääkide vahelisi  $\alpha$ -1,4-glükosiidsidemeid  $\beta$ -eliminatsiooni teel, pektiinmetüülesterasid eemaldavad pektiini küljest metüülrühmi ja polügalakturonaasid depolümeriseerivad pektiini hüdroolüüsi teel (Abbott ja Boraston, 2008; Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). Pel ja Peh eelistavad substraadina demetüleeritud pektiini, samas kui Pln ja Pme metüleeritud substraati (Collmer ja Keen, 1986). Kõiki pektinolüütilisi ensüüme viiakse rakust välja tüüp II sekretsioonisüsteemi ehk *Out*-süsteemi kasutades (Salmond, 1994).

Pektaatlüaasid on kõige olulisem pektinolüütiliste ensüümide rühm, mida märgmädanikku tekitavad patogeenid sünteesivad. Pektaatlüaaside tootmist indutseerivad polügalakturoonhappe (PGA) lagundamisel tekkivad galakturoonhappe dimeerid (McMillan *et al.*, 1994). Pektaatlüaasid esinevad tihti mitme erineva isovormina, millest igaüks on erineva substraadi spetsiifilisusega ning ekspresseerub infektsiooni erineval etapil. Lisaks on Pel-i isovormide ekspresseerumisel olulised ka temperatuur, pH ja muud keskkonnatingimused (Bartling *et al.*, 1995). Lülitades välja ühe Pel-i isovormi produktsiooni säilib patogeeni virulentsus teiste Pel-ide arvelt. Siiski sõltuvalt inaktiveeritud Pel-ist võib patogeeni virulentsus osaliselt väheneda (Heikinheimo *et al.*, 1994). *Pw* tüvi SCC3193 toodab nelja erinevat pektaatlüaasi: PelA, PelB, PelC ja PelD (Heikinheimo *et al.*, 1994).

#### 1.4.2. Tsellulaasid

Tsellulaasid lagundavad taime primaarse ja sekundaarse rakuseina ühte põhikomponenti tselluloosi. Tselluloos on lineaarne polüsahhariid, mis koosneb omavahel  $\beta$ -1,4-sidemega seotud glükoosi monomeeridest. Tema ülesandeks on anda taimerakule tugevus ja kuju (Whitaker, 1971).

*Pw* toodab kahte erinevat tüüpi tsellulaasi: CelV1 ja CelS (Cooper ja Salmond, 1993; Mäe *et al.*, 1995; Saarilahti *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994). Inaktiveerides *Pw*-s *celS* geeni ei muutu patogeeni virulentsuse tase, küll aga *celV1* geeni inaktiveerimisel on näha märgatavat virulentsuse vähenemist (Mäe *et al.*, 1994; Saarilahti *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994). Seega ei ole tsellulaasid taime nakatamisel hädavajalikud, kuid nende produktsioon koos teiste PCWDE-ga võimaldab tungida sügavamale taimekoesse ning muudab rünnaku efektiivsemaks (Walker *et al.*, 1994).

### 1.4.3. Proteaasid

Proteaasid on ensüümid, mis lagundavad valke, hüdroolüüsides aminohappejääkide vahelisi peptiidsidemeid. Proteaasid võivad olla nii ekstra- kui ka intratsellulaarsed. *Pw-1* kodeerib ekstratsellulaarset proteaasi geen *prtW*. *prtW* ekspresseerub varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, erinevalt teistest ekstratsellulaarsetest ensüümidest, mille maksimaalne ekspressioon saavutatakse alles statsionaarse kasvufaasi alguses (Marits *et al.*, 1999; Pirhonen *et al.*, 1991). Ekstratsellulaarsete proteaaside ülesandeks peetakse patogeeni varustamist valkude biosünteesiks vajalike aminohapetega ning peremehe kaitsevalkude lagundamist (Heilbronn ja Lyon, 1990; Kyöstiö *et al.*, 1991).

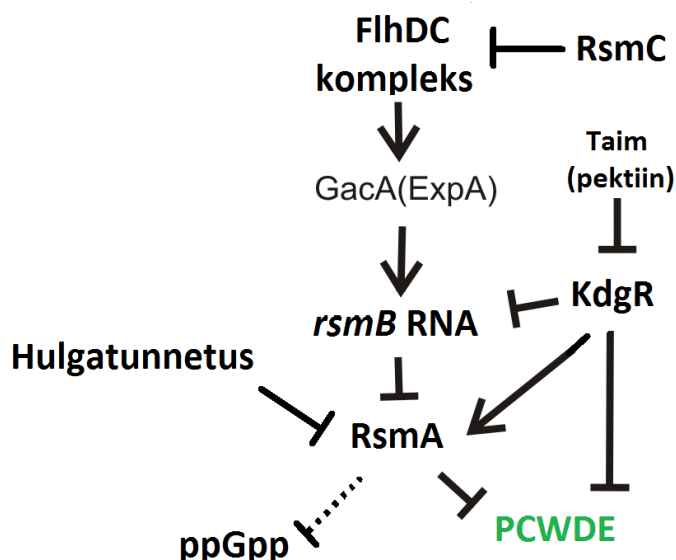
*prtW* geeni inaktiveerimisel kaotab patogeen täielikult võime toota ekstratsellulaarseid proteaase ning tema virulentsus väheneb umbes 40% võrra (Marits *et al.*, 1999). Seega ei ole PrtW taime nakatamise kohapealt esmatähtis, kuid selle produktsioon muudab infektsiooni tõhusamaks.

### 1.4.4. Liikuvus

*Pw-1* on edukaks taime nakatamiseks oluline ka liikuvus, mille tagavad peritrihhaalselt paiknevad viburid. Vähenenud virulentsust on märgata nii täielikult liikumisvõimetutel kui ka osaliselt vähenenud liikumisvõimega mutantidel, kusjuures kõikidel mutantidel oli säilinud võime sünteesida kõiki taime rakuseina lagundavaid ensüüme (Pirhonen *et al.*, 1991). Viburite sünteesi kontrollib FlhDC kompleks (Wei *et al.*, 2001), mis lisaks mõjutab kaudselt ka PCWDE-de tootmist (Cui *et al.*, 2008; Andresen *et al.*, 2010).

### 1.5. Virulentsusfaktorite regulatsioon

Et taime nakatamine oleks efektiivne, peab virulentsusfaktorite tootmine algama just õigel ajal ehk sobivate keskkonnatingimuste tekkimisel (niiskus, madal hapnikusisaldus, sobiv temperatuur), kui patogeeni populatsiooni arvukus on  $10^6$  rakku/ml ehk patogeen on jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi (Pérombelon ja Kelman, 1980; Pirhonen *et al.*, 1993). Virulentsusfaktorite sünteesi eest vastutab keerukas regulatoorne võrgustik, kuhu kuuluvad mitmed regulaatorid ning regulatsioonisüsteemid, näiteks hulgatunnetus, KdgR regulaatorvalk, Rsm süsteem, mitmed kahekomponendilised regulatsioonisüsteemid, FlhDC kompleks ja muud (Joonis 1.).



**Joonis 1. Virulentsusfaktorite regulatsioonimudel.** (Kõiv *et al.*, 2013, modifitseeritud)

Joonisel on näidatud olulisemad regulaatorid, mis mõjutavad rakuseina lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide tootmist. → tähistab regulaatori positiivset efekti ning ⊥ negatiivset efekti.

### 1.2.1. KdgR

KdgR on negatiivne regulaatorvalk, mis kontrollib otseselt kõikide pektiini lagundamisega seotud geenide ekspressiooni, seal hulgas ka pektaatlüaase (Reverchon *et al.*, 1991). Indutseeriva signaali puudumisel käitub KdgR kui repressor (Joonis 1.), seondudes dimeerina 25-aluspaari pikkusele DNA lõigule ehk KdgR-boxile, mis asub promootori -35 ja -10 regioonide lähedal ning blokeerib seetõttu transkriptsiooni. Induktori esinemisel aga, moodustab KdgR kompleksi induktoriga ning vabastab DNA, mis võimaldab käivitada transkriptsiooni (Nasser *et al.*, 1992). Induktoriteks on pektiini laguproduktid, näiteks raku tekivad 2-keto-3-deoksüglükonaat (KDG), 5-keto-4-deoksüuronaat (DKI) ja 2,5-diketo-3-deoksüglükonaat (DKII) (Condemine *et al.*, 1984; 1986).

Lisaks reguleerib KdgR PCWDE-de sünteesi ka kaudselt läbi Rsm süsteemi (Joonis 1.). KdgR seondub *rsmB* geenil paiknevate KdgR-boxidega ja takistab *rsmB* sRNA sünteesi. Ühtlasi indutseerib KdgR ka RsmA tootmist (Liu *et al.*, 1999; Hyytiäinen *et al.*, 2001).

### 1.2.2. Hulgatunnetus

Bakterid suudavad üksteisega suhelda produtseerides ning eraldades kasvukeskkonda keemilisi signaalmolekule, milleks gramnegatiivsetel bakteritel on enamasti atsüülhomoseriin laktoonid (AHL) ehk autoinduktorid. Autoinduktori kogunemisel keskkonda

seondub see teatud kontsentratsioonil regulaatorvalguga ning tekkinud kompleks mõjutab tema poolt kontrollitavate geenide ekspressiooni positiivselt või negatiivselt (Nealson *et al.*, 1970; Nealson ja Hastings, 1979). Seda nähtust kutsutakse hulgatunnetuseks (QS; ingl. k. *quorum sensing*). Hulgatunnetuse esinemist on täheldatud nii gramnegatiivsetel kui ka grampositiivsetel bakteritel (Miller ja Bassler, 2001). Esmakordselt kirjeldati hulgatunnetust gramnegatiivsetel merebakteritel *Vibrio fischeri* ja *Vibrio harveyi*, kelle bioluminestsentsi esinemine on reguleeritud hulgatunnetuse poolt (Nealson ja Hastings, 1979). Lisaks bioluminestsentsile võib hulgatunnetus reguleerida ka konjugatsiooni (Zhang *et al.*, 1993), antibiootikumide ja teiste sekundaarsete metaboliitide tootmist ning virulentsusfaktorite sünteesi paljudes inimese-, looma- ja taimepatogeenides (Whitehead *et al.*, 2001), seal hulgas biokile moodustamist *Pseudomonas aeruginosa*'l (Winson *et al.*, 1995) ja PCWDE-de tootmist *Pw-1* (Pirhonen *et al.*, 1993).

Märgmädanikku põhjustavatel bakteritel kontrollib hulgatunnetus virulentsusfaktorite produktsiooni. Patogeeni tungimisel taime ei hakata PCWDE-sid enne tootma, kui bakteripopulatsioon saavutab tiheduse  $10^6$  rakku/ml (Barnard ja Salmond, 2007). *Pw-1* koosneb QS-süsteem kolmest valgust: ExpI, ExpR1 ja ExpR2. ExpI vastutab autoinduktoriga sünteesi eest, milleks *Pw-s* on N-atsüül homoseriinlaktoonid (AHL) (Pirhonen *et al.*, 1993). ExpR1 ja ExpR2 on regulaatorvalgud, mis autoinduktoriga puudumisel seonduvad DNA-ga ning aktiveerivad *rsmA* geeni ekspressiooni, mis kodeerib globaalset regulaatorvalku RsmA. AHL esinemisel aga seonduvad ExpR1 ja ExpR2 AHL-ga ning *rsmA* transkriptsiooni ei aktiveerita (Cui *et al.*, 2006). Seega avaldub ExpI, ExpR1 ja ExpR2 mõju PCWDE-de tootmisele kaudselt läbi Rsm süsteemi (Joonis 1.) (Sjöblom *et al.*, 2006).

### 1.2.3. Rsm süsteem

Rsm/Csr süsteem on oluline posttranskriptsiooniline regulatsioonisüsteem, mille moodustavad kaks komponenti: mRNA-de stabiilsust mõjutav valk RsmA/CsrA ja regulatoorne RNA *rsmB/csrB* (Romeo *et al.*, 1993).

RsmA on posttranskriptsiooniline regulaatorvalk, mis seondub sihtmärk mRNA SD (Shine-Dalgarno) järjestustega ja blokeerib translatsiooni, mis omakorda destabiliseerib mRNA ja muudab selle kättesaadavaks rakus olevatele RNAasidele (Cui *et al.*, 1995). *rsmB* on väike mitte-transleeruv regulatoorne RNA. Tal on antagonistlik mõju RsmA-le, sidudes vaba RsmA-d ning vähendades sellega RsmA negatiivset mõju mRNA-de stabiilsusele (Liu *et al.*, 1998). *rsmB*-l esineb palju üheahelalisi GGA motiive, mis on vajalikud RsmA seondamiseks (Valverde *et al.*, 2004). Vaba RsmA esinemine rakus vähendab virulentsusfaktorite,

sealhulgas PCWDE-de tootmist (Joonis 1.). RsmA tootmine on represseeritud hulgatunnetuse (Cui *et al.*, 2006) ja indutseeritud statsionaarse faasi sigma faktori RpoS-i poolt (Mukherjee *et al.*, 1998). *rsmB* süntees on indutseeritud ExpS/ExpA kahekomponendilise süsteemi *expA* geeni ekspressiooni poolt, mis omakorda on veel kontrollitud FlhDC kompleksi poolt (Chatterjee *et al.*, 2009). Regulaatorvalk KdgR reguleerib nii *rsmA* kui ka *rsmB* geenide ekspressiooni (Liu *et al.*, 1999; Hyytiäinen *et al.*, 2001). Lisaks mõjutab väike regulaatorvalk RsmC kaudselt RsmA ja *rsmB* vahekorda, surudes maha *rsmB* tootmist ning aktiveerides RsmA sünteesi (Cui *et al.*, 1999).

Kuigi Rsm süsteem on posttranskriptsiooniline regulatsioonisüsteem, näitas Jekaterina Frolova oma magistritöös (2012), et Rsm süsteem mõjutab PCWDE-de tootmist ka transkriptsiooni tasemel. Kuidas ta seda teeb, ei ole täpselt teada. *Pw* lähedastel liikidel on näidatud, et PCWDE-de tootmine allub CRP valgu poolt vahendatud glükoosi kataboliitsele repressioonile (Hubbard *et al.*, 1978; Reverchon *et al.*, 1997), seega võiks arvata, et ka *Pw* puhul on PCWDE-de transkriptsioon reguleeritud CRP poolt.

### 1.3. CRP ja kataboliitne repressioon

cAMP retseptorvalk (CRP; ingl. k. *cAMP receptor protein*) ehk kataboliitne aktivaatorvalk (CAP; ingl. k. *catabolite activator protein*) on globaalne transkriptsiooni aktivaator. Näiteks *Escherichia coli*'s reguleerib CRP otseselt umbes 200 geeni, mis on jagatud funktsiooni alusel 48 erinevasse geeniklassi (Martinez-Antonio ja Collado-Vides, 2003). CRP-d on põhjalikult uuritud seoses *E. coli lac* operoniga, kus ta vahendab kataboliitset repressiooni (Reznikoff, 1992). Kataboliitne repressioon on nähtus, kus glükoosi esinemisel kasvukeskkonnas represseeritakse teiste kataboolsete operonide transkriptsiooni (Ebright, 1993).

CRP on dimeerne valk, mis koosneb kahest identsest subühikust. Tal on DNA-ga seondumiseks kindel 22-aluspaari pikkune konsensusjärjestus, mis paikneb sõltuvalt kataboolse promootori klassist kas promootori ees või kattub promootori -35 elemendiga (Ebright *et al.*, 1989; Ebright, 1993; Niu *et al.*, 1996).

CRP on kataboolselt represseeritud tingimustel ehk glükoosi juuresolekul kasvanud rakkudes inaktiivses vormis. CRP seondub DNA-ga kompleksis oma efektormolekuliga, milleks on adenosiin-3',5'-monofosfaat (cAMP) (Ebright, 1993). Glükoos inhibeerib adenülaaditsüklaasi, mis vahendab cAMP tootmist ATP-st (Makman ja Sutherland, 1965). Seega on glükoosi juuresolekul cAMP kontsentratsioon madal, CRP-d ei aktiveerita ning kataboolsetelt geenidelt ei toimu transkriptsiooni. Glükoosi lõppemisel kasvukeskkonnas aga

tõuseb cAMP kontsentratsioon rakus, CRP moodustab cAMP-ga aktiivse kompleksi, mis seondumisel DNA-le painutab seda umbes 90° võrra (Ebright, 1993; Schultz *et al.*, 1991). RNA polümeraasi efektiivne promootorile kinnitumine ja transkriptsiooni alustamine on tagatud CRP-cAMP kompleksi ja RNA polümeraasi vaheliste valk-valk interaktsioonidega (Ebright, 1993).

Paljudel patogeenidel allub ka virulentsusgeenide ekspressioon kataboliitsele repressioonile. Näiteks *Pseudomonas aeruginosa* eksotoksiin A-d, tüüp IV piilisid ja Tüüp 3 sekretsioonisüsteemi kodeerivad geenid on reguleeritud Vfr-cAMP kompleksi poolt (Fuchs *et al.*, 2010). Vfr on CRP-perekonda kuuluv transkriptsioonifaktor, mis sarnaselt CRP-le sõltub cAMP kontsentratsioonist ning kataboliitset repressioonist (Suh *et al.*, 2002).

Ka märgmädanikku põhjustavatel bakteritel on leitud seos virulentsusgeenide avaldumise ja kataboliitse repressiooni vahel. *Pectobacterium carotovorum*'i (varem nimetatud *Erwinia carotovora*) rakusisese pektinolüütilise ensüümi endopolügalakturonaat trans-eliminaasi (PGTE) tootmine allub kataboliitsele repressioonile (Moran ja Starr, 1969). Hubbard *et al.*, (1978) näitasid, et glükoosi lisamisel eelnevalt PGA-l kasvatatud rakkudele väheneb PGTE aktiivsus 1,8-3 korda võrreldes kontrollkultuuriga, kuhu ei ole lisatud glükoosi. Samas glükoosi ja cAMP samaaegsel lisamisel elimineeritakse glükoosi represseeriv mõju ning PGTE aktiivsus tõuseb umbes 1,5 korda võrreldes vaid PGA-l kasvava kontrollkultuuriga. Lisaks näitasid Reverchon *et al.* (1997), et *Pw*-le lähedasel liigil *Dickeya dadantii*'l (varem nimetatud *Erwinia chrysanthemi*) on CRP põhiliseks pektinolüütiliste geenide aktivaatoriks. Pektinolüütiliste ensüümide kataboliitne repressioon avaldub nii glükoosil kasvades, kui ka küllastumata digalakturoonhappejääkide toimetel, mis tekivad PGA lagundamisel pektinolüütiliste ensüümide poolt (Tsuyumu, 1979; Collmer ja Bateman, 1981). Seda nähtust nimetatakse enese-kataboliitseks repressiooniks (ingl. k. *self-catabolite repression*) (Katz ja Englesberg, 1971).

#### **1.4. Rakusisene energiatase**

Rakusisest energiataset määratakse adenülaadi energialaenguga (AEC; *adenylate energy charge*). AEC väärtus jääb 0-1 vahele (Atkinson ja Walton, 1967). *E. coli* puhul on näidatud, et normaaselt kasvavates rakkudes jääb AEC väärtus 0,8-0,95 vahele. AEC väärtustel 0,5-0,8 on rakud veel elujõulised, kuid ei jagune ning väärtustel alla 0,5 hakkavad nad surema (Chapman *et al.*, 1971).

*E. coli* *csrA*<sup>-</sup> tüves on ATP-d vähem kui metsiktüves (Sabnis *et al.*, 1995). Seega on *csrA*<sup>-</sup> tüves AEC väärtus madalam kui metsiktüves. Kuna CsrA on RsmA homoloog, võib arvata, et sarnaselt *csrA*<sup>-</sup> tüvele, kus CsrA-d ei toodeta, on ka *rsmA*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes, kus RsmA-d ei toodet, AEC väärtus madalam kui metsiktüves.

#### **1.4.1. ppGpp**

Rakkude energeetilist seisundit saab jälgida ka ppGpp (guanosiintetrafosfaat) hulga järgi rakus. ppGpp on signaalmolekul, mis moodustub rakus stressivastuse käigus. Ta on globaalne regulaator, mis mõjutab raku elutegevust, seal hulgas kasvu, liikuvust, adapteerumisvõimet, virulentsust ja muud (Magnusson *et al.*, 2005). Tema peamiseks ülesandeks on kasvu ning valgusünteesi peatamine toitainete vaeguse korral (Svitil *et al.*, 1993). ppGpp-d toodavad *E. coli*'s valgud RelA ja SpoT (Potrykus ja Cashel, 2008).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Jekaterina Frolova näitas oma magistritöös (2012), et posttranskriptsiooniline regulaatorvalk RsmA mõjutab lisaks PCWDE-de translatsioonile ka nende transkriptsiooni. Kuidas ta seda teeb, ei ole teada. Taimepatogeenidel *Pectobacterium carotovorum*'il (varem nimetatud *Erwinia carotovora*) ja *Dickeya dadantii*'l (varem nimetatud *Erwinia chrysanthemi*) on näidatud pektinaaside produktsiooni regulatsioon CRP vahendatud kataboliitse repressiooniga, mille tõttu glükoosi esinemisel kasvukeskkonnas pidurdub pektinaaside tootmine (Moran ja Starr, 1969; Reverchon *et al.*, 1997).

Hüpotees: Kui *Pw* mutant *rsmA*<sup>-</sup>/*rsmC*<sup>-</sup> toodab pidurdamatult PCWDE-sid ja flagelliini, on tema rakusisene energiatase madalam kui metsiktüvel, cAMP-d on rohkem ja cAMP-st (CRP-st) sõltuvaid geene (ka ekstratsellulaarseid ensüüme) transkribeeritakse rohkem kui metsiktüves.

Bakalaureusetöö eesmärkideks olid:

- Konstrueerida *Pw* tüve SCC3193 *crp*<sup>-</sup> mutant.
- Uurida glükoosi ja cAMP mõju PCWDE-de tootmisel *Pw* metsiktüves ning *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> mutantides.
- Uurida *Pw* metsiktüve ning *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> mutantide rakusisest energiataset glükoosil ja PGA-1 kasvatades.



## 2.1. Materjalid ja metoodika

### 2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

**Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid**

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
SCC3193	Metsiktüvi	Pirhonen <i>et al.</i> , 1988
SCC3193rsmB	<i>rsmB</i> ::Cm <sup>R</sup>	Kõiv <i>et al.</i> , 2010
SCC3193rsmC	<i>rsmC</i> ::Cm <sup>R</sup>	Meie labor (avaldamata)
<b>Plasmiidid</b>		
pKRIPTprtW	Transkriptsiooni initsatsiooni aktiivsuse jälgimise vektor, mis sisaldab multikloneerimissaidis <i>prtW</i> geeni promootorjärjestust, millele järgneb Rnase III lõikesait ja reportergeen <i>gusA</i> ; Amp <sup>R</sup>	Frolova, J., 2012
pKRIPTcelV	Transkriptsiooni initsatsiooni aktiivsuse jälgimise vektor, mis sisaldab multikloneerimissaidis <i>celV</i> geeni promootorjärjestust, millele järgneb Rnase III lõikesait ja reportergeen <i>gusA</i> ; Amp <sup>R</sup>	Frolova, J., 2012
pKRIPTpehA	Transkriptsiooni initsatsiooni aktiivsuse jälgimise vektor, mis sisaldab multikloneerimissaidis <i>pehA</i> geeni promootorjärjestust, millele järgneb Rnase III lõikesait ja reportergeen <i>gusA</i> ; Amp <sup>R</sup>	Frolova, J., 2012

**Tabel 2. Kasutatud praimerid.**

Praimeri nimi	Praimeri järjestus (5'→3')
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
GusMun	ACTGATCGTTAAACTGCCTGG

### 2.2.2. Söötmed ja kasvatamine

*Pectobacterium wasabiae* tüvesid kasvatati temperatuuril 30°C kas LB vedelsöötmes või M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana kas 0,2% glükoosi või 0,2% polügalakturoonhapet (PGA). Tardsöötmete valmistamisel lisati LB söötmele agarit (15 g/l) (Sambrook ja Russell, 2001). Vajadusel lisati söötmetele antibiootikume: ampitsilliin (Amp; 140 µg/ml), klooramfenikool (Cm; 20 µg/ml). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti bakterikultuure loksutil.

Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsust määrati selektiivsöötmetega indikaatortassidel, mis valmistati järgmiselt: tsellulaaside aktiivsust määrati karboksümetüülselluloosiga (CMC; 0,1%) LB tardsöötmele; polügalakturonaasi aktiivsust määrati PGA-ga (0,7%) LB tardsöötmele; proteaasi aktiivsust määrati rasvavaba piima (5%) ja PGA-d (0,7%) sisaldaval nn. piima tassil (PP). Kõigile tardsöötme tassidele lisati 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiidi (X-gal; 80 µg/ml).

### 2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i matriitsina kasutati rakulüsaati. Rakkude lüüsimiseks lisati 25 µl-le steriilsele veele tikuotsaga rakke ning kuumutati 96°C juures 10 minutit PCR-i masinas. Seejärel lüsaat tsentrifuugiti 6000 g juures (Eppendorf Centrifuge 5415R) ning PCR-i reaktsiooni matriitsina kasutati DNA-d sisaldavat supernatanti.

PCR-i reaktsioonisegu üldmahuga 20 µl sisaldas: 1x PCR puhvrit (10x PCR puhvri koostis: (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,05 U/µl Taq DNA polümeraasi (Prof. J. Sedman), 0,4 pmol praimereid Fw ja GusMun (Tabel 2.), 0,5 µl rakulüsaati ja lõppmahuni destilleeritud vett.

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon, polümeraasi aktiveerimine: 95°C 3 minutit
2. DNA denaturatsioon: 95°C 30 sekundit

3. Praimerite seandumine DNA-le: 55°C 30 sekundit

4. DNA süntees: 72°C 50 sekundit

5. DNA lõpusüntees: 72°C 10 minutit

Etappe 2-4 korrati 25 korda.

#### **2.2.4. DNA geelelektroforees**

PCR-i fragmentide olemasolu ja pikkust kontrolliti geelelektroforeesiga. PCR-i reaktsioonisegule lisati 1/10 üldmahust markervärvi, mis sisaldas 0,04% broomfenoolsinist 50%-lises glütseroolis. Segu kanti 1%-lisele etiidiumbromiidi (0,25 µg/ml) sisaldavale agarosgeelile (1% agarosi 1x TAE puhvis: 50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvis pingel 100 volti ning geel ilmutati UV valguses.

#### **2.2.5. Elektroporatsioon**

Elektroporatsioonikompetentsete rakkude saamiseks kasvatati *Pw* erinevate tüvede rakke 5 ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum, üleöö statsionaarsesse kasvufaasi. Hommikul tehti 1:50 lahjendus 50 ml-sse LB söötmesse ning rakke kasvatati tiheduseni  $OD_{580} \approx 0,6$ . Seejärel rakud jahutati kiirelt jääl ning tsentrifuugiti (1500g, 15 minutit) 4°C juures. Rakke pesti kaks korda sama koguse 10% glütserooliga ning üks kord poole koguse 10% glütserooliga. Rakud võeti üles 40 µl-s 10% glütseroolis.

Elektrokomponentidele lisati ~10 ng plasmiidset DNA-d ning rakkude-DNA segu viidi eelnevalt jääl jahutatud elektroporatsiooniküveti. Elektroporeeriti BIO-RAD Pulseriga pingel 2,5 kV. Järgnevalt lisati rakkudele 1 ml LB söödett ning kasvatati ~1 tund 30°C juures lokustil. Seejärel tsentrifuugiti rakud sööttest välja ning plaaditi ampitsilliini sisaldavale tardsöötmele.

#### **2.2.6. β-glükuronidaasi aktiivsuse määramine**

β-glükuronidaasi (GusA) aktiivsuse määramiseks vedelkultuurist kasvatati tüvesid statsionaarse kasvufaasini ~10 tundi LB söötmes ampitsilliini juuresolekul. Seejärel tehti 1:100 lahjendus M9 minimaalsöötmesse, mis sisaldas 0,4% PGA-d ning kultuure kasvatati üleöö.

Hommikul tehti üleöökultuuridest lahjendused  $OD_{580}=0,05$  M9 minimaalsöötmesse, kuhu oli lisatud süsinikuallikaks kas 0,2% glükoosi või 0,2% PGA-d. 150 µl lahjendatud kultuure pipeteeriti steriilsesse 96 kaevuga mikrotiiterplaadile ning kasvatati aereerides loksutil (Heidolph Titramax 1000) 30°C juures. Viie tunni pärast lisati ühele osale glükoosi

(lõppkontsentratsioon 0,5%), teisele glükoosi ja cAMP-d (lõppkontsentratsioonid vastavalt 0,5% ja 5 mM) ning kolmandale osale ei lisatud midagi. GusA aktiivsust määrati ajapunktides 5, 6, 7, 8, 9, 10 tund.

$\beta$ -glükuronidaasset aktiivsust mõõdeti mustal läbipaistmatul 96 kaevuga mikrotiiterplaadil (Greiner bio-one), kus 5  $\mu$ l rakke permeabiliseeriti 90  $\mu$ l-s CTAB puhvris (0,05% heksadetsüültrimetüülammooniumbromiid, 0,27%  $\beta$ -merkaptotanool ja 1 mM EDTA 50 mM naatriumfosfaatpuhvrist pH=7) ning loksutati 10 minutit. Seejärel lisati 5  $\mu$ l MUG (4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-glükuroniid; 0,6 mg/ml) lahust, mis on substraadiks gusA geeni produktile  $\beta$ -D-glükuronidaasile. Substraadi lagunemisel tekib fluorestseeruv produkt 4-metüülumbelliferoon (MU). Loksutati veelkord 10 minutit ning seejärel mõõdeti MU akumul eerumist ergastades 360 nm ja emiteerides fluorestsentsi 465 nm juures spektrofotomeetril Infinite M200 PRO (Tecan). Arvutati relatiivse fluorestsentsi ühiku tõusu minutis rakutiheduse suhtes (RFU/ min OD<sub>580</sub>). Kõik proovid määrati vähemalt kolmes korduses.

#### **2.2.7. Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsuse määramine tardsöötmel**

Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsuse määramiseks tardsöötmel kasutati CMC, PGA ja PP tasse (vt. ptk. 2.2.2).

Tsellulaaside aktiivsuse määrati CMC tassidel inkubeerides bakterirakke 48 tundi temperatuuril 30°C. Tasse värviti 0,1% Kongo punasega 15 minutit. Seejärel tassid puhastati veega ning töödeldi 1 M NaCl-ga 30 minutit. Tsellulaaside aktiivsust määrati kolooniate ümber tekkinud värvivabade tsoonide läbimõõdu järgi.

Polügalakturonaasi aktiivsuse määramiseks inkubeeriti bakterirakke PGA tassil 48 tundi. Seejärel tasse töödeldi 1 M CaCl<sub>2</sub>-ga 30 minutit. Ensüümi aktiivsust jälgiti kolooniate ümber tekkinud läbipaistvate tsoonide läbimõõdu järgi.

Proteaasi aktiivsuse määramiseks inkubeeriti bakterirakke PP tassil 48 tundi temperatuuril 30°C. Proteaasi aktiivsust tuvastati kolooniate ümber tekkinud läbipaistvate proteolüüsi tsoonide läbimõõdu järgi.

#### **2.2.8. Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsuse määramine vedelsöötmes**

Ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks kasvatati kultuure üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes, kuhu vajadusel lisati sobiv antibiootikum. Hommikul tehti üleöö kultuuridest lahjendused OD<sub>580</sub>=0,05 50 ml-sse M9 minimaalsöötmesse, kuhu süsinikuallikaks oli lisatud

kas glükoosi (0,2%) või PGA-d (0,2%). Ekstratsellulaarsete ensüümide aktiivsust määrati 3, 6 ja 9 tundi kasvanud rakkudest. Selleks filtreeriti sööde läbi filtri (Millipore HAWP02500, 45 µm) ning koguti 1 ml läbijooksu (edaspidi nimetatud kui proov), mida säilitati -20°C juures ning kasutati hiljem ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks.

**Polügalakturonaasi (Peh)** aktiivsuse määramiseks pipeteeriti mikrotiiterplaadile 5 µl proovi. Lisati 45 µl Peh puhvrit ja 50 µl 1% PGA-d ning hoiti 30 minutit temperatuuril 30°C. Reaktsioon peatati pipeteerides 27 µl-t reaktsioonisegu 27 µl-le vasereagendile. Segu kuumutati 15 minutit temperatuuril 97°C ning seejärel jahutati. Lisati 27 µl Peh värvilahust ning pipeteeriti mullitamise lõppemiseni. Lisati 162 µl vett ning tsentrifuugiti 3000 g juures 10 minutit. Mikrotiiterplaadile pipeteeriti 200 µl supernatanti ning mõõdeti OD 500 nm juures (Infinite M200 PRO, Tecan).

Peh puhver (100 ml) sisaldab: 0,444 mM NaCl, 0,111 mM naatriumatsetaat, 4,44 mM EDTA (pH 8) ja lõppmahuni vett.

Vasereagent (100 ml) sisaldab: 2,4 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ja 1,2 g kaalium-naatrium-tartaati lahustununa 25 ml-s vees, millele on lisatud 4 ml 10% CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 1,6 g NaHCO<sub>3</sub>, 1,8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja mahuni vett.

Peh värvilahus sisaldab: 5 g ammoniummolübdiaati lahustatuna 90 ml-s vees, kuhu on lisatud 4,2 ml kontsentreeritud H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja eraldi 5 ml-s vees lahustatud 0,6 g Na-arsenaati.

**Proteaasi (Prt)** aktiivsuse määramiseks segati kokku 35 µl 2% azokaseiini ja 15 µl 1 M Tris (pH 8) proovi kohta. Eppendorfi tuubi pipeteeriti 100 µl proovi ning lisati 50 µl valmistatud segu. Inkubeeriti 4 tundi temperatuuril 30°C. Seejärel peatati reaktsioon lisades 75 µl 14% perkloorhapet ning tsentrifuugiti 3000 g juures 10 minutit. Mikrotiiterplaadile kanti 150 µl supernatanti, millele lisati 15 µl 10 M NaOH-d ning mõõdeti OD 436 nm juures (Infinite M200 PRO, Tecan).

#### **2.2.9. Rakusisese energiataseme mõõtmine**

Rakusisese energiataseme mõõtmiseks määrati rakusisene nukleotiidne koostis kõrgsurvevedelikkromatograafiat (HPLC; ingl. k. *high-pressure liquid chromatography*) kasutades. Selleks kasvatati kultuure üleöö 5 ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel lisati sobiv antibiootikum. Hommikul tehti üleöö kultuuridest lahjendused OD<sub>580</sub>=0,05 50 ml-sse M9 minimaalsöötmesse, kuhu süsinikuallikaks oli lisatud kas glükoosi (0,2%) või PGA-d (0,2%). Rakusisese energiataseme määramiseks filtreeriti 10, 5 või 2 ml söödet läbi filtri (Millipore HAWP02500, 45 µm) vastavalt 3., 6. ja 9. tunnil. Filter koos rakkudega kasteti kohe 600 µl-

sse külma 1 M-sse äädikhappesse ning külmutati vedelas lämmastikus, et vältida nukleotiidi lagunemist. Saadud proove säilitati -80°C juures.

Edasiseks proovide töötlemiseks sulatati need 0°C juures ning hoiti jääl 30 minutit, et äädikhape lüüsiks rakud. Filtrist vabanemiseks tehti Eppendorfi tuubi põhja steriilse nõelaga auk, pandi filtriga Eppendorfi tuub uue tuubi sisse ning tsentrifuugiti paar sekundit 5000 g juures. Proovid külmutati vedelas lämmastikus ning kuivatati ~6 tundi lüofilisaatoris. Seejärel lahustati proovid 200 µl-s jääkülmas mQ vees ning tsentrifuugiti 13000 g juures vähemalt 30 minutit. Supernatant kanti puhtasse Eppendorfi tuubi ning säilitati -20°C juures.

Proovide nukleotiidne koostis määrati kõrgsurvevedelikkromatograafil Agilent 1100 Series. Saadud kromatogrammidele määrati adenülaadi energialaeng (AEC) ja ppGpp suhe teistesse G-nukleotiididesse.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. PCWDE-de transkriptsiooni efektiivsus

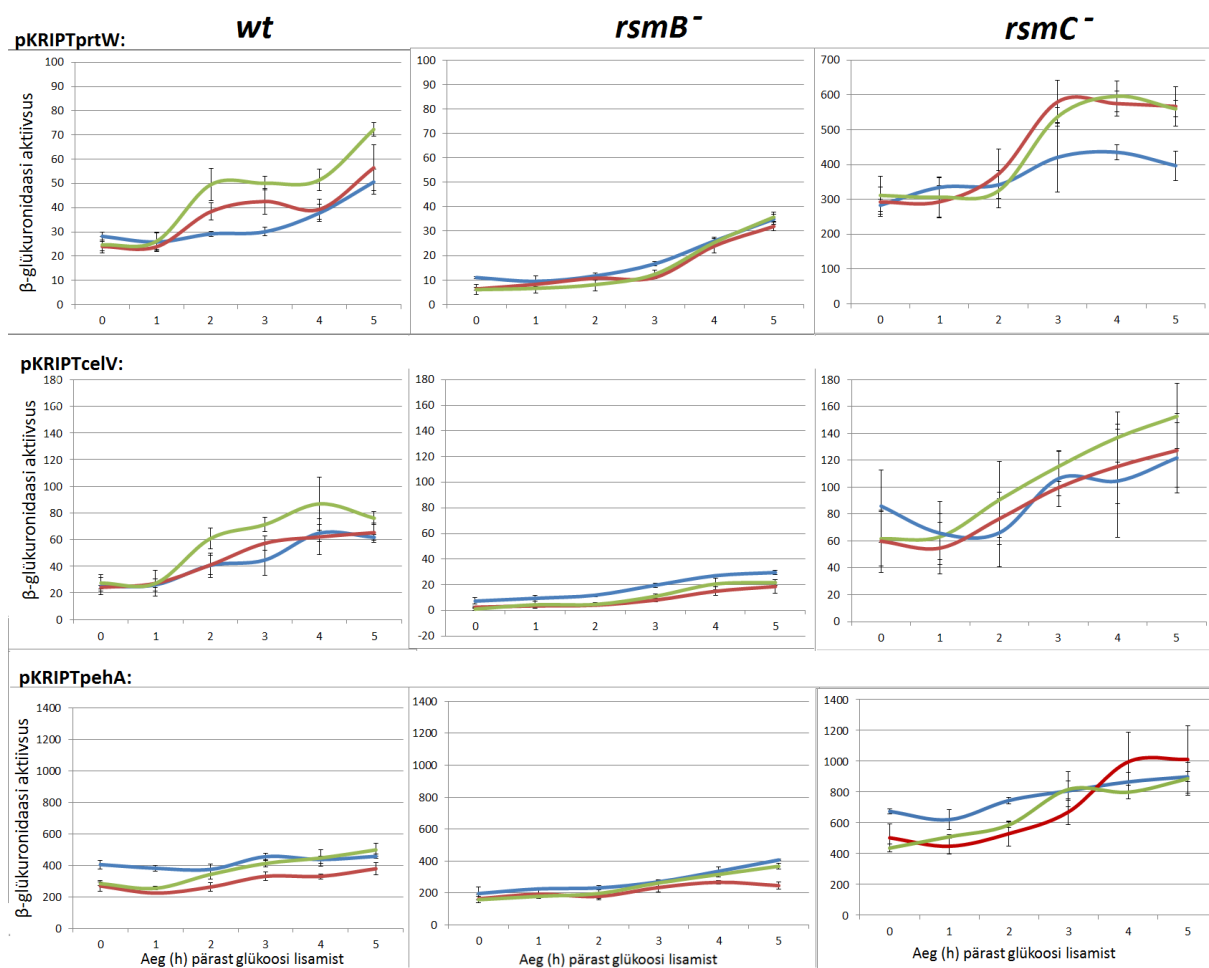
Minu eesmärgiks oli uurida Rsm süsteemi mõju PCWDE-de transkriptsiooni efektiivsusele, kui süsinikuallikaks söötmes on kas glükoos või taimset komponenti imiteeriv PGA. PCWDE-de transkriptsiooni efektiivsuse mõõtmiseks *P<sub>w</sub>* erinevates tüvedes kasutasin Jekaterina Frolova poolt magistritöös (2012) konstrueeritud transkriptsiooni efektiivsuse mõõtmise konstrukte pKRIPTprtW, pKRIPTcelV ja pKRIPTpehA, mis on loodud vastavalt proteaasi, tsellulaasi ja polügalakturonaasi transkriptsiooni efektiivsuse mõõtmiseks. Kõik konstruktid viisin elektroporatsiooniga *wt*, *rsmB<sup>-</sup>* ja *rsmC<sup>-</sup>* tüvedesse.

Selleks kasvasin kõiki töös kasutatud tüvesid, kuhu oli viidud üks kolmest transkriptsioonikonstrukstist (pKRIPTprtW, pKRIPTcelV või pKRIPTpehA), M9 minimaalsöötmel, kuhu oli ainsaks süsinikuallikaks lisatud kas 0,2% glükoosi või 0,2% PGA-d. Viie tunni möödudes lisasin ühele osale 0,2% PGA-ga söötmetest glükoosi lõppkontsentratsiooniga 0,5% ning alustasin  $\beta$ -glükuronidaasi aktiivsuse mõõtmist, mida kordasin iga tunni tagant. Saadud tulemused on esitatud joonisel 2.

Saadud katsetulemused näitavad, et metsiktüves ja *rsmC<sup>-</sup>* tüves on *prtW* transkriptsiooni efektiivsus PGA+glükoosiga söötmel kasvades kõrgem kui glükoosil kasvades. PGA-ga söötmel kasvades on metsiktüve transkriptsiooni efektiivsus madalam kui PGA+glükoosiga söötme puhul, samas kui *rsmC<sup>-</sup>* tüve puhul nende kahe söötme vahel erinevusi ei paista. *rsmB<sup>-</sup>* tüvel ei sõltu *prtW* transkriptsiooni efektiivsus söötmest.

*celV* transkriptsiooni efektiivsus metsiktüves glükoosil ja PGA-l kasvades on madalam kui PGA+glükoosiga söötmel, samas kui *rsmB<sup>-</sup>* tüvel on see glükoosil kasvades kõrgem kui PGA või PGA+glükoosiga söötmel. *rsmC<sup>-</sup>* tüve puhul on mõõtmisviga liialt suur, et söötmetest tingitud erinevusi näha.

Metsiktüve ja *rsmC<sup>-</sup>* tüve puhul on *pehA* transkriptsiooni efektiivsus mõõtmise esimesel paaril tunnil glükoosil kasvades kõrgem kui PGA+glükoosiga söötmel, hiljem efektiivsused võrdsustuvad. Samas kui PGA-l kasvades on metsiktüvel transkriptsiooni efektiivsus madalam kui glükoosiga või PGA+glükoosiga söötmel, *rsmC<sup>-</sup>* tüvel PGA ja PGA+glükoosiga söötmetel erinevusi ei esine. *rsmB<sup>-</sup>* tüves on mõnel tunnil näha, et glükoosil kasvades on transkriptsiooni efektiivsus kõrgem kui PGA+glükoosiga söötmel. Sarnaselt metsiktüvele on ka *rsmB<sup>-</sup>* tüves PGA-l kasvades transkriptsiooni efektiivsus madalam kui glükoosil või PGA+glükoosil kasvades.



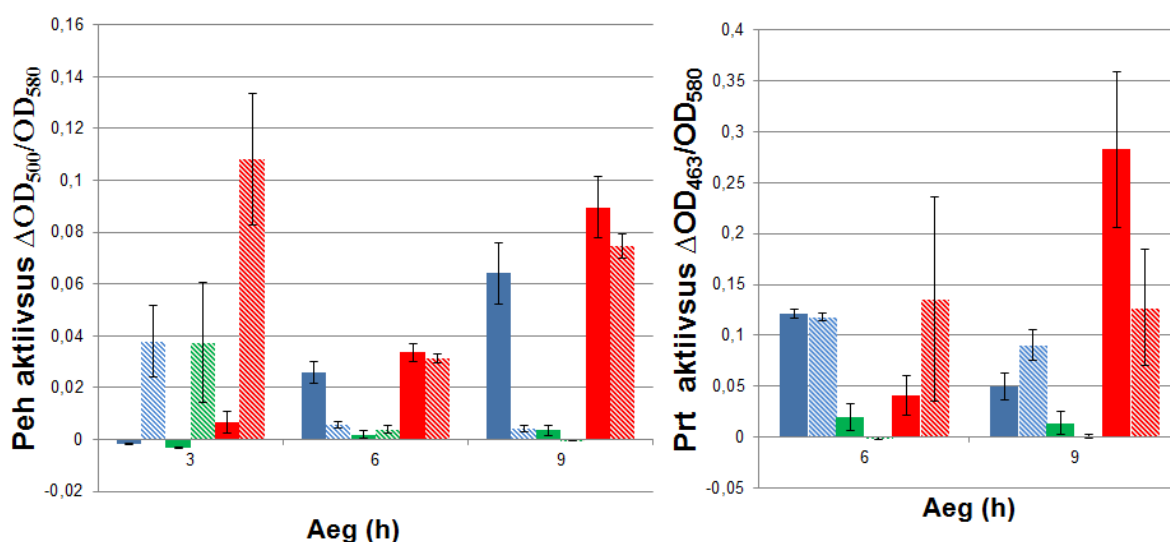
**Joonis 2. PCWDE-de transkriptsiooni efektiivsus M9 minimaalsöötmes, kuhu on lisatud süsinikuallikana kas 0,2% glükoosi (—), 0,2% PGA-d (—) või 0,2% PGA-d + 0,5% glükoosi (—).  $\beta$ -glükuronidaasi aktiivsus mõõdeti eksponentsiaalsesse kasvufaasi jõudmisel viiendal tunnil ning korrati iga tunni järel. Viiendal tunnil lisati ühele osale 0,2% PGA-ga söötmetele glükoosi (0,5%), teisele osale ei lisatud midagi. GusA aktiivsus on avaldatud kui  $\text{RFU min}^{-1} \text{OD}_{580}^{-1}$ . pKRIPTprtW graafikutel on erinev skaala.**

Minu katsete tulemused ei ole kooskõlas Jekaterina Frolova poolt saadud tulemustega. Nimelt Frolova (2012) näitas, et PGA+glükoosiga sööde tõstab nende kõigi ekstratsellulaarsete ensüümide transkriptsiooni võrreldes glükoosil kasvatamisega. Samas aga minu tulemustest on näha, et vaid mõnel juhul on transkriptsiooni efektiivsus kõrgem PGA+glükoosiga söötmel kasvades, samas kui mõnel juhul on ta hoopiski kõrgem glükoosil kasvades ning mõnel juhul ei ole vahet kahe söötme vahel märgata. Enamustel juhtudel glükoosi lisamisel PGA-ga söötmele transkriptsiooni efektiivsus tõuseb kõrgemaks kui PGA-ga söötmel, kuhu glükoosi ei ole lisatud, seega võib märgata glükoosi aktiveerivat toimet PCWDE-de transkriptsioonile.



### 2.3.2. PCWDE-de tootmine vedelsöötmes

Lisaks jälgisin, milline on polügalakturonaasi (Peh) ja proteaasi (Prt) tootmine vedelsöötmes. Selleks kasvasin *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvesid M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud ainsa süsinikuallikana kas 0,2% glükoosi või 0,2% PGA-d. Ensüümide aktiivsust määrasin eksponentsiaalse faasi alguses kolmandal tunnil, eksponentsiaalses faasis kuuendal tunnil ning statsionaarses faasis üheksandal tunnil. Tulemused on toodud joonisel 3.



**Joonis 3.** Polügalakturonaasi ja proteaasi tootmine *wt* (■), *rsmB*<sup>-</sup> (■) ja *rsmC*<sup>-</sup> (■) tüvedes M9 minimaalsöötmes, kuhu on lisatud kas 0,2% glükoosi (ruuduline) või 0,2% PGA-d (värv). Ensüümiaktiivsus on avaldatud kui optilise tiheduse muutus rakutiheduse kohta.

Katse tulemustest selgub, et eksponentsiaalse faasi alguses on Peh-i aktiivsus detekteeritav vaid glükoosiga söötmetel. Peh-i aktiivsuse kõrged väärtused eksponentsiaalse faasi alguses võivad tuleneda üleöökultuuri mõjudest, millest lahjendused tehti. Eksponentsiaalse faasi ajal on aga märgata metsiktüve puhul PGA poolt põhjustatud induktsiooni Peh-i tootmisele, mis säilib ka statsionaarsesse faasi jõudes. *rsmC*<sup>-</sup> tüves, kus RsmA valku on vähe ning toimub PCWDE-de üleproduksioon, on sõltumata söötimest Peh-i tootmine kõrge ning seda nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarsesse faasi jõudes. *rsmB*<sup>-</sup> tüves, kus *rsmB* RNA puudumise tõttu on RsmA valku palju, on Peh-i tootmine madal sõltumata söötimest ja kasvufaasist.

Proteaasi aktiivsust eksponentsiaalse faasi alguses märgata ei ole. Eksponentsiaalses faasis on proteaasi tootmine metsiktüve puhul mõlemal söötmel samasugune, kuid stasionaarsesse faasi jõudes väheneb proteaasi aktiivsus PGA-ga söötmel. *rsmC*<sup>-</sup> tüvel jääb eksponentsiaalses faasis proteaasi tootmine PGA-ga söötmel madalamaks kui metsiktüvel, samas kui statsionaarsesse

faasi jõudes võib märgata proteaasi tootmise suurenemist. *rsmB*<sup>-</sup> tüvel on proteaasi tootmine mõlema söötme korral madal.

Selle katse tulemused ei ole kooskõlas transkriptsioonikonstruktide efektiivsuse mõõtmise katsetulemustega, kus metsiktüve puhul Peh-i transkriptsiooni aktiivsus oli glükoosil kasvades kõrgem kui PGA-l kasvades. Siin aga on Peh-i tootmine suurenenud PGA-l kasvades. *rsmB*<sup>-</sup> tüvel on eelmises katses Peh-i transkriptsiooni aktiivsus kõrgem glükoosiga söötmel, samas kui Peh-i tootmisel erinevusi kahe söötme vahel ei esine. *rsmC*<sup>-</sup> tüvel on aga nii Peh-i transkriptsiooni aktiivsus kui ensüümi tootmine mõlemal söötmel samasugune.

Lisaks sarnaselt varasematele tulemustele on ka ensüümide mõõtmisel näha *rsmC*<sup>-</sup> tüve statsionaarsesse faasi jõudes proteaasi tootmisel PGA induktsiooni. Samas aga erinevalt minu eelmise katse tulemustest on eksponentsiaalses faasis proteaasi tootmine *rsmC*<sup>-</sup> tüvel PGA-ga söötmel madalam kui metsiktüvel. *rsmB*<sup>-</sup> tüve puhul nii proteaasi transkriptsioonil kui ka ensüümi tootmisel kahe söötme vahel erinevusi ei ole. Proteaasi transkriptsiooni efektiivsuse mõõtmisel metsiktüvel puuduvad erinevused kahe söötme vahel, kuid ensüümide mõõtmisel on sarnaselt eksponentsiaalses faasis proteaasi tootmine mõlemal söötmel ühesugune, samas kui statsionaarsesse faasi jõudes on glükoosiga söötmel näha kõrgemat proteaasset aktiivsust.

Nende kahe katse tulemuste erinevused võivad tuleneda erinevast kasvatamisest, nimelt transkriptsioonikonstruktide efektiivsuse mõõtmisel kasvatati rakke väikeses mahus (150 µl) mikrotiiterplaadil, samas kui ensüümide mõõtmisel aga suuremas mahus (50 ml) kolvis. Lisaks ei ole ka valitud ajapunktid nendes kahes katses täpselt samad.

Ensüümide mõõtmisel nähtud PGA indutseeriv mõju võib tuleneda sellest, et PGA juuresolekul seotakse KdgR regulaatorvalk PGA laguproduktide poolt, mille tulemusena vabastatakse PCWDE-de promootorpiirkond ning alustatakse transkriptsiooni. Kuid transkriptsioonikonstruktide efektiivsuse mõõtmisel oli sellist efekti näha vaid *rsmC*<sup>-</sup> tüvel pKRIPTprtW konstrukti puhul.

### **2.3.3. PCWDE-de tootmine tardsöötmetassidel**

Järgmiseks jälgisin ka seda, mil määral erineb PCWDE-de tootmine tardsöötmel ja vedelsöötmes kasvatamisel, sest tardsöötmed sisaldavad rohkem lämmastikuühendeid kui vedelsöötmed. Koloonia ümber tekkiv sõõr tähistab ala, kuhu bakterirakud on sekreteerinud ensüüme, mis on lagundanud söötmes olevaid komponente.

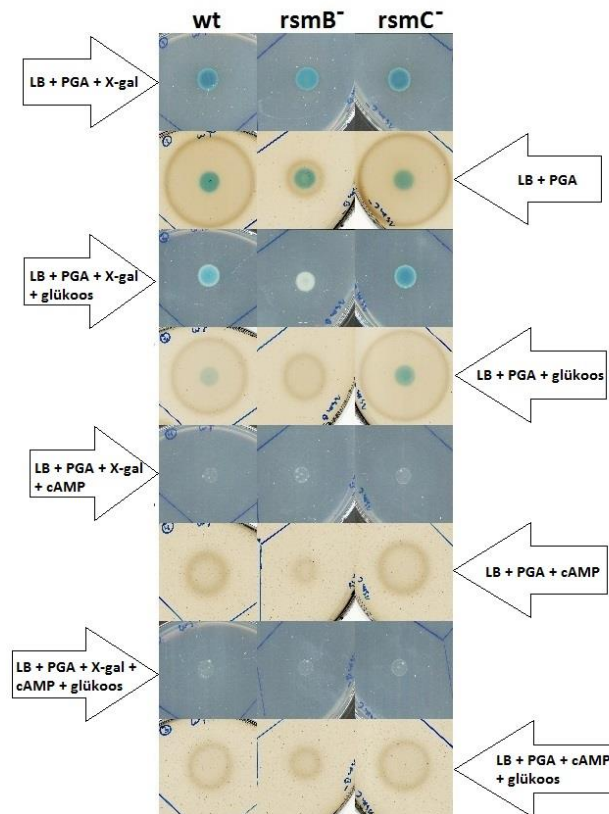
Kõikidele tassidele lisasin ka X-gal-i (80 µg/ml), et jälgida *lac* operoni kataboliitset repressiooni *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes. *Pw* kromosoomis asub terve β-galaktosidaasi kodeeriv geen, mille substraadiks on X-gal. Substraadi lagundamisel värvuvad kolooniad siniseks ning selle järgi on võimalik detekteerida β-galaktosidaasi aktiivsust. *E. coli csrA*<sup>-</sup> tüves (CsrA on RsmA homoloog) on vähem ATP-d kui metsiktüves (Sabnis *et al.*, 1995). Seega võib arvata, et sarnaselt *csrA*<sup>-</sup> tüvele, kus CsrA-d ei toodeta, on ka *rsmA*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes, kus RsmA-d ei toodeta, ATP-d vähem kui metsiktüves. Seetõttu peaks olema *rsmA*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes palju cAMP-d, mis aktiveerib *lac* operoni ning hakatakse tootma β-galaktosidaasi, mille tulemusel värvuvad kolooniad siniseks. *rsmB*<sup>-</sup> tüves on aga RsmA-d palju, seega on ka palju ATP-d ning vähe cAMP-d. Seega *lac* operoni ei aktiveerita ning kolooniad jäävad valgeks. PGA tassidel (Joonis 4.), millel jälgitakse polügalakturonaasi (Peh) tootmist on näha, et glükoosi lisamisel söötmesse toimub *lac* operoni kataboliitne repressioon. Nimelt *rsmB*<sup>-</sup> tüve kolooniad jäävad valgeks, samas kui *rsmC*<sup>-</sup> tüvi värvub tumedamalt sinisemaks kui metsiktüvi.

PGA tassidele (Joonis 4.) glükoosi lisamisel on näha, et *rsmC*<sup>-</sup> tüves polügalakturonaasi tootmine ei muutu võrreldes kontrolliga, kuhu ei ole glükoosi lisatud, samas kui metsiktüve puhul on näha mõningast ensüümi aktiivsuse vähenemist. See viitab sellele, et Peh-i tootmine võiks alluda glükoosi kataboliitsele repressioonile. Küll aga *rsmB*<sup>-</sup> tüves vastupidiselt oodatavale ensüümiaktiivsuse vähenemisele on märgata hoopiski Peh-i tootmise suurenemist.

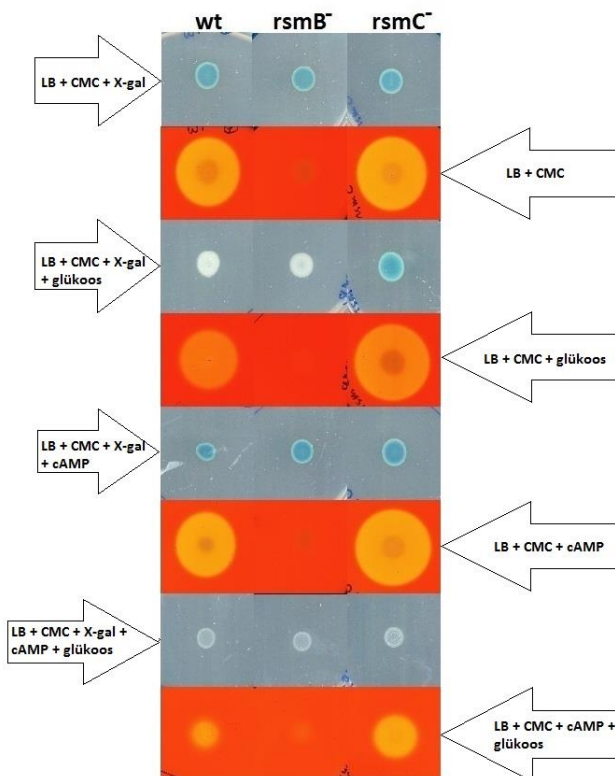
Ka CMC tassidele (Joonis 5.) glükoosi lisamisel võib näha *lac* operoni allumist glükoosi kataboliitsele repressioonile, kus nii metsiktüves kui ka *rsmB*<sup>-</sup> tüves on *lac* operon represseeritud, kuid *rsmC*<sup>-</sup> tüves mitte. Glükoosi lisamisel CMC söötmele on näha tsellulaasi tootmise vähenemist metsiktüvel võrreldes kontrolliga, samas kui *rsmC*<sup>-</sup> tüvel ensüümi tootmine ei muutu. *rsmB*<sup>-</sup> tüvi ei tooda CMC tassidel kasvades tsellulaasi.

Ka PP tassidel (Joonis 6.), kus jälgitakse proteaasi aktiivsust on näha sarnaselt CMC tassidele *lac* operoni allumist glükoosi kataboliitsele repressioonile. Proteaasi tootmisel on näha aga vastupidist efekti, kus *rsmC*<sup>-</sup> tüves on proteaasi tootmine natukene vähenenud võrreldes kontrolliga, samas kui nii metsiktüves kui ka *rsmB*<sup>-</sup> tüves on see märgatavalt kasvanud.

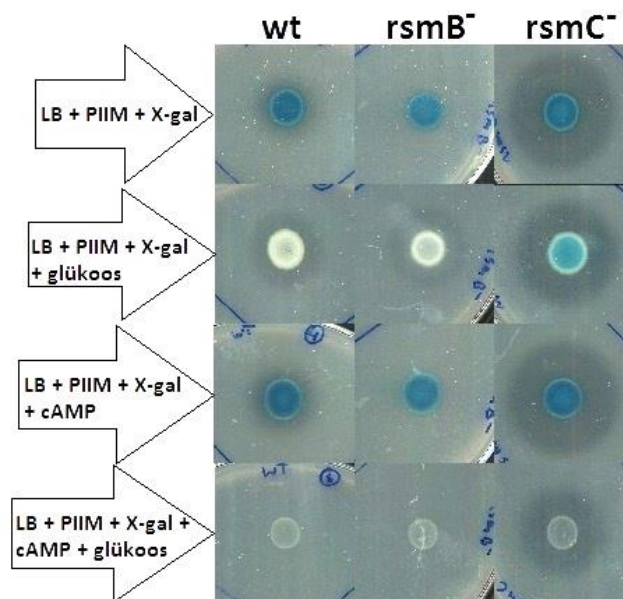
Seega ei allu polügalakturonaasi, tsellulaas ja proteaasi tootmine glükoosi kataboliitsele repressioonile sama moodi nagu seda teeb *lac* operon. Siiski on nende kõikide ensüümide tootmine mõjutatud glükoosi esinemisest kasvukeskkonnas.



Joonis 4. Glükoosi ja cAMP mõju polügalakturonaasi toomisele kasvamisel PGA tassidel.



Joonis 5. Glükoosi ja cAMP mõju tsellulaasi tootmisele kasvamisel CMC tassidel.



**Joonis 6. Glükoosi ja cAMP mõju proteaasi tootmisele kasvamisel PP tassidel.**

#### **2.3.4. cAMP mõju PCWDE-de tootmisele**

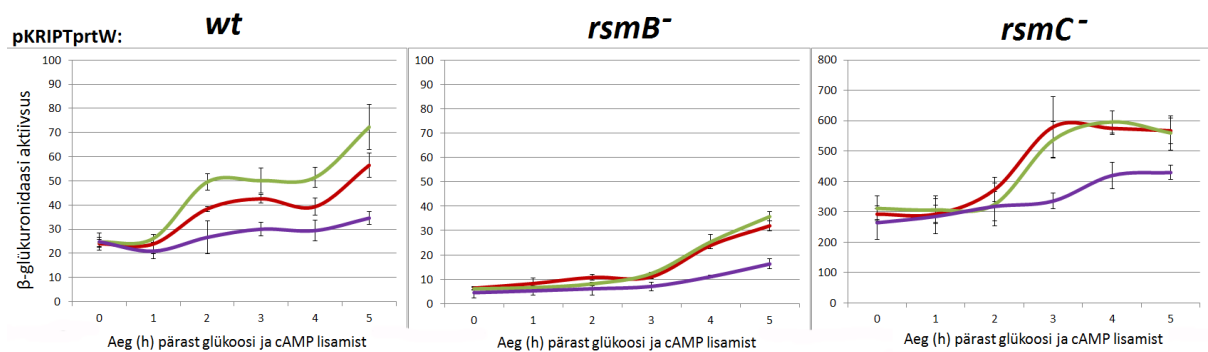
Edasiseks plaaniks oli välja selgitada, kas PCWDE-de tootmine allub CRP valgu poolt vahendatud glükoosi kataboliitsele repressioonile. Selleks üritasin luua *crp*<sup>-</sup> genotüübiga mutanti, kuid *Pw* madala elektroporatsiooni- ja homoloogilise rekombinatsioonisageduse tõttu see ei õnnestunud.

Seejärel jäljendasin 1978. aastal Hubbard *et al.* poolt tehtud katset, kus cAMP ja glükoosi lisamisel kasvukeskkonda näidatati, et *Pectobacterium carotovorum*'il (varem nimetatud *Erwinia carotovora*) allub ühe pektinolüütilise ensüümi tootmine kataboliitsele repressioonile. Selleks kasutasin *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvesid, kuhu olin eelnevalt elektroporatsiooniga viinud ühe kolmest transkriptsiooni efektiivsuse mõõtmise konstruktidest (pKRIPTprtW, pKRIPTcelV või pKRIPTpehA). See on sama katse, mis glükoosi mõju uurimisel. Kultuure kasvasin 0,2% PGA-ga söötmel, mis imiteerib taimes olevaid tingimusi ning indutseerib PCWDE-de tootmist. Kui kultuurid jõudsid eksponentsiaalsesse kasvufaasi, lisasin ühele osale kultuuridest glükoosi (0,5%), teisele osale glükoosi (0,5%) ja cAMP-d (5 mM) ning kolmas osa jäi kontrolliks, kuhu ei lisanud midagi. Seejärel mõõtsin β-glükuronidaasi aktiivsust iga tunni järel.

Tulemustest ilmneb, et cAMP ja glükoosi koos lisamisel kasvukeskkonda väheneb PCWDE-de transkriptsioon võrreldes kontrolliga, kuhu ei lisatud midagi. Samas aga ainult glükoosi lisamisel söötmesse PCWDE-de transkriptsioon kas suureneb või jääb samale tasemele kui kontrollkultuurides. Saadud katsetulemuste illustreerimiseks on joonisel 7 ära toodud vaid

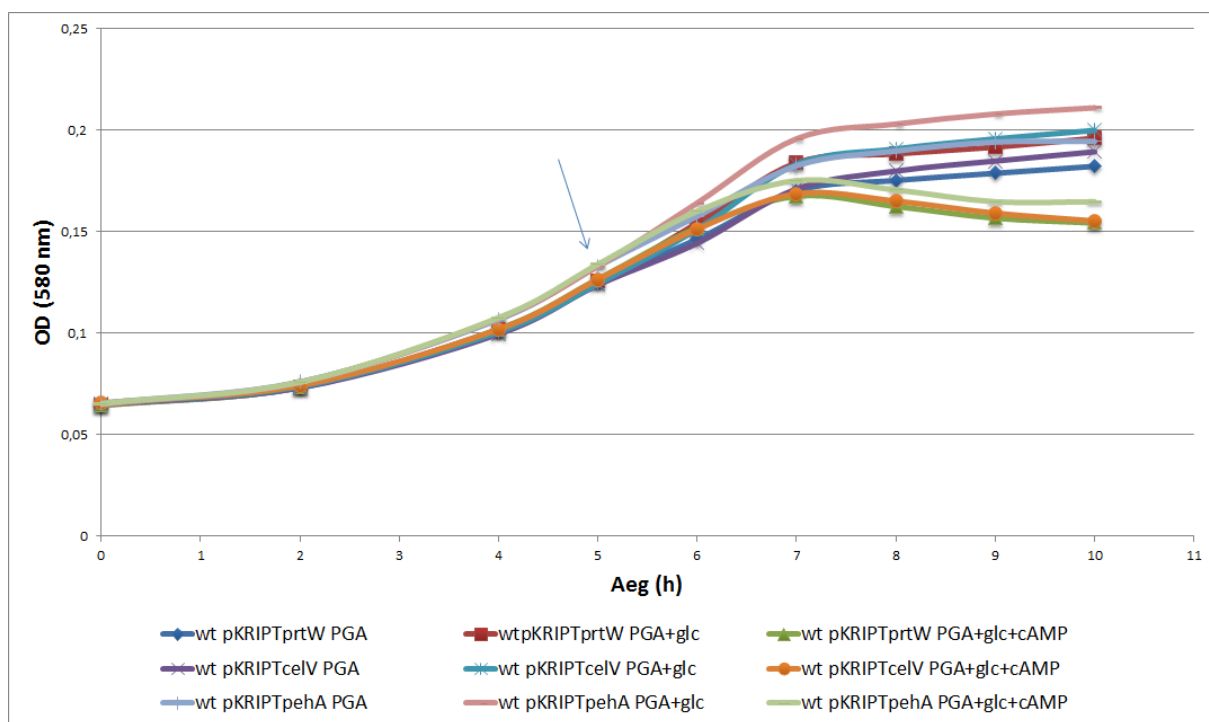
proteaasi transkriptsiooni efektiivsus *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes, kuid ka tsellulaas ja polügalakturonaas käitusid proteaasile sarnaselt.

Need tulemused on täielikult vastuolus Hubbard *et al.* (1978) poolt saadud tulemustele, kus näidati, et glükoosi lisamisel kasvukeskkonda pidurdub pektinolüütilise ensüümi tootmine ning cAMP ja glükoosi koos lisamisel söötmesse pöördub glükoosi represseeriv mõju ning ensüümi tootmine tõuseb kõrgemaks kui kontrollkultuuris, kuhu ei lisatud midagi.



**Joonis 7. Proteaasi (prtW) transkriptsiooni efektiivsus M9 minimaalsöötmes, kuhu on lisatud süsinikuallikana 0,2% PGA-d.** Viiendal tunnil lisati ühele osale kultuuridest glükoosi (0,5%) (—), teisele osale glükoosi (0,5%) ja cAMP-d (5mM) (—) ning kolmandale osale ei lisatud midagi (—). β-glükuronidaasi aktiivsus mõõdeti eksponentsiaalsesse kasvufaasi jõudmisel viiendal tunnil ning korrati iga tunni järel. GusA aktiivsus on avaldatud kui RFU min<sup>-1</sup> OD<sub>580</sub><sup>-1</sup>. Graafikutel on erinevad skaalad.

Lisaks jälgisin ka bakterikultuuride kasvu ning siin oli näha, et sarnaselt Hubbard *et al.* (1978) saadud tulemustele pidurdas cAMP ja glükoosi koos lisamine söötmesse bakterite kasvu ning seda kõigi tüvede ja transkriptsioonikonstruktid puhul. Illustreerimiseks on joonisel 8 ära toodud vaid metsiktüve kõigi kolme transkriptsioonikonstruktiga kasvukõverad, kuid ka *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüved kasvasid sarnaselt.



**Joonis 8. *Pw* pKRIPTprtW, *Pw* pKRIPTtclV ja *Pw* pKRIPTpehA kasvukõverad M9 minimaalsöötmel.** Eksponentsiaalses faasis viiendal tunnil lisati (nool) ühele osale kultuuridest glükoosi (0,5%), teisele osale glükoosi (0,5%) ja cAMP-d (5mM) ning kolmandale osale ei lisatud midagi.

cAMP mõju PCWDE-de tootmisele jälgisin ka vastavatel indikaatortassidel. PGA tassidel (Joonis 4.), kus jälgitakse polügalakturonaasi aktiivsust on näha, et cAMP ning cAMP ja glükoosi koos lisamine söötmesse pidurdab bakterite kasvu ning sellest tulenevalt ilmselt ka ensüümi tootmist. CMC tassidel (Joonis 5.), kus detekteeritakse tsellulaasi aktiivsust on näha sarnast mõju cAMP ja glükoosi koos lisamisel söötmesse, ainult cAMP lisamine kasvule ja tsellulaasi tootmisele mõju ei avalda. Ka PP tassidel (Joonis 6.), millel on näha proteaasid aktiivsust on näha CMC tassidega sarnast efekti, kus cAMP ja glükoosi koos lisamine pidurdab kasvu ning cAMP üksinda lisamine ei mõjuta ei kasvu ega proteaasi tootmist.

Seega cAMP ja glükoosi koos lisamine söötmesse häirib *Pw* elutegevust, mis väljendub kasvu pidurdumises ning ilmselt sellest tulenevalt on ka vähenenud PCWDE-de tootmine. Normaalses rakus on glükoosi esinemise korral kasvukeskkonnas cAMP-d vähe ning alles glükoosi lõppemisel hakatakse seda juurde tootma. Nende koos lisamisel söötmesse satub aga bakter stressi. Ainult cAMP lisamine kasvukeskkonda PCWDE-de tootmist ei mõjuta, küll aga võib samuti kasvu pidurdada, nagu näidatud PGA tassidel.

### 2.3.5. Rakusisene energiatase

Edasi huvitas meid veel see, kas *wt*, *rsmB<sup>-</sup>* ja *rsmC<sup>-</sup>* tüvede energeetiline seisund vastab varasemale hüpoteesile. Selle hüpoteesi kohaselt *rsmA<sup>-</sup>* ja *rsmC<sup>-</sup>* tüvedes, kus RsmA puudumise tõttu toodetakse PCWDE-sid ja vibureid ülehulgas, on ATP-d rakus vähem ning adenülaadi energialaeng (AEC) madalam kui metsiktüves (Kõiv *et al.*, 2013). AEC leidmiseks määrasin HPLC-ga rakusisese nukleotiidskoostise eksponentsiaalse faasi alguses kolmandal tunnil, eksponentsiaalse faasi ajal kuuendal tunnil ja statsionaarse faasi alguses üheksandal tunnil kõigil kolmel tüvel ning arvutasin sealt adenülaadi energialaengu, mis on väljendatud järgmise valemiga (Atkinson ja Walton, 1967):

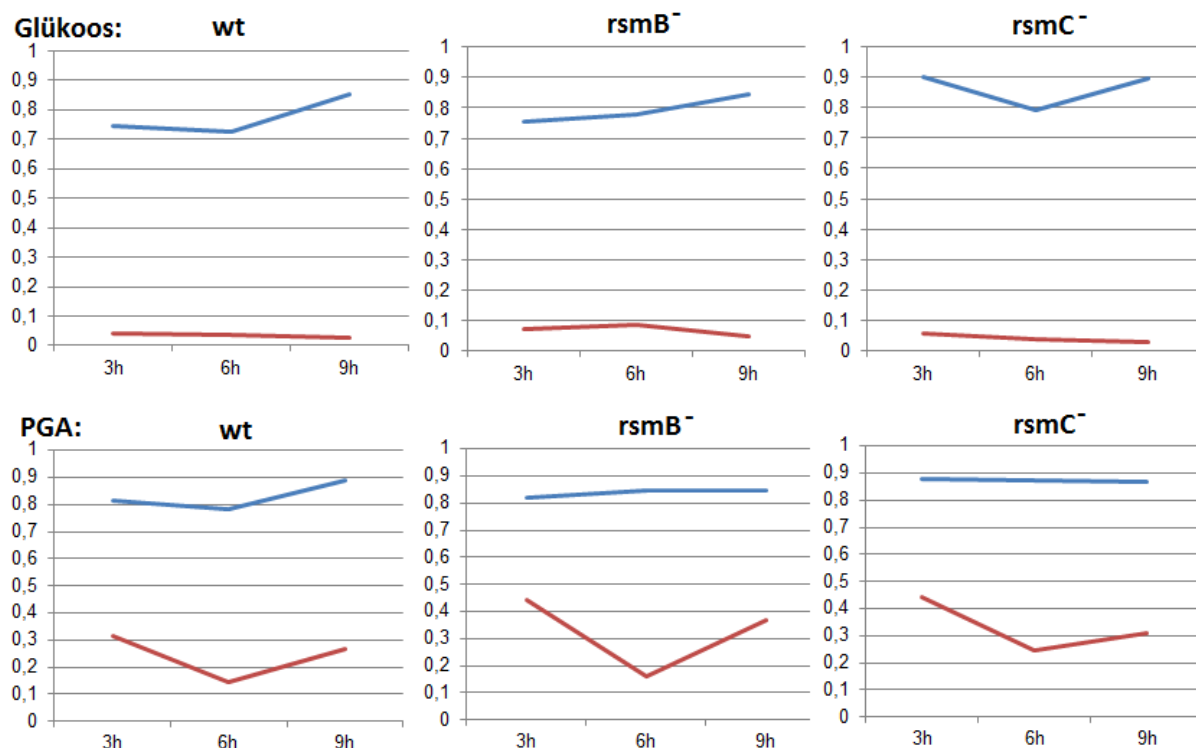
$$\text{adenülaadi energialaeng (AEC)} = \frac{[\text{ATP}] + 0,5 * [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

Seda katset on jõutud teha vaid üks kord, kuid esialgsetest tulemustest on näha, et sõltumata söötimest on *rsmC<sup>-</sup>* tüves adenülaadi energialaeng suurem kui metsiktüves või *rsmB<sup>-</sup>* tüves (joonis 8). Seega ei vasta minu katsetulemused Kõiv *et al.* (2013) poolt välja pakutud hüpoteesile.

Normaalselt kasvavates rakkudes jääb AEC 0,8-0,95 vahele (Chapman *et al.*, 1971). Minu katses glükoosiga söötmel kasvanud rakkudes jääb aga AEC 0,8-st natukene madalamaks, mis viitab sellele, et proovide võtmise käigus võis toimuda ATP mõningast lagunemist ning katset peaks uuesti kordama.

Lisaks leidsin ka **ppGpp** suhte teistesse G-nukleotiididesse. Katse tulemustest on näha, et ppGpp hulk rakus on kõrgem PGA-ga söötmel kasvades kõikide tüvede puhul (Joonis 8.). See võib viidata rakus tekkivale olukorrale, kus toidu kättesaamiseks vajalik masinavärk tuleb ümber lülitada PGA lagundamisele ning sellest tulenevalt on rakud rohkem koormatud, kui glükoosil kasvades ning seetõttu võib ka ppGpp hulk rakkudes kõrgem olla.





**Joonis 8. Adenülaadi energialaeng (—) ja ppGpp suhe teistesse G-nukleotiididesse (—).**

HPLC-ga määrati rakusisene nukleotiidne koostis kasvamise kolmandal, kuuendal ja üheksandal tunnil ning arvutati sealt adenülaadi energialaeng ning ppGpp suhe teistesse G-nukleotiididesse.

### 2.3.6. Järeldused

Saadud tulemused näitavad, et *P<sub>w</sub>* PCWDE-de tootmine ei allu CRP vahendatud glükoosi kataboliitsele repressioonile. Glükoosi lisamisel PGA-ga söötmele võib märgata glükoosi aktiveerivat toimet PCWDE-de transkriptsioonile. PCWDE-de tootmine on mõjutatud glükoosi esinemist kasvukeskkonnas, mõnel juhul indutseerides ning mõnel juhul pidurdades PCWDE-de tootmist. Nii tard- kui vedelsöötmes kasvatades võib märgata glükoosi aktiveerivat mõju proteaasi tootmisele, samas kui polügalakturonaasi toomisel on näha vastupidist efekti, kus glükoosi esinemine kasvukeskkonnas pidurdab polügalakturonaasi tootmist. Erinevalt varasemast hüpoteesist näitavad minu esialgsed katsetulemused, et vaatamata suurenenud PCWDE-de ja flagelliini tootmisele *rsmC<sup>-</sup>* tüves, ei ole seal rakusisene energiatase madalam kui metsiktüves.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas rakuseina lagundavate ensüümide tootmine *Pectobacterium wasabiae*'s on mõjutatud CRP vahendatud glükoosi kataboliitsest repressioonist. Selleks oli algselt plaanis konstrueerida *P<sub>w</sub> crp* tüvi. Kuna aga see ei õnnestunud, jälgiti PCWDE-de tootmist glükoosi ning cAMP lisamisel kasvukeskkonda *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes. Hüpoteesi kohaselt on *rsmA*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes, kus puudub RsmA valk ning seetõttu toodetakse rohkelt PCWDE-sid ja flagelliini, madal rakusisene energiatase (Kõiv *et al.*, 2013). Sellest tulenevalt võib eeldada, et *rsmA*<sup>-</sup> ja *rsmC*<sup>-</sup> tüvedes rohkem cAMP-d ning cAMP-st (CRP-st) sõltuvaid geene transkribeeritakse suuremal määral kui metsiktüves. Minu tulemused näitasid, et PCWDE-de tootmine ei allu CRP vahendatud glükoosi kataboliitsele repressioonile, kuid on mõjutatud glükoosi esinemisest kasvukeskkonnas. Nimelt nii tard- kui vedelsöötmes glükoos aktiveerib proteaasi ja pidurdab polügalakturonaasi tootmist.

Lisaks eelpool mainitud hüpoteesile võrdlesin rakusisest energiataset *P<sub>w</sub>* metsiktüves ja *rsmC*<sup>-</sup> mutandis ning ei näinud erinevusi. Seega ei ole minu tulemused kooskõlas Kõiv *et al.* (2013) poolt välja pakutud hüpoteesiga. Siiski tulemuste kinnitamiseks tuleks katsed korrata.

## Catabolite repression in *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 virulence

Sirli Luup

### SUMMARY

*Pectobacterium wasabiae* (*Pw*) is a phytopathogenic bacterium that causes soft rot disease, which affects many economically important crops including potato, carrot and cucumber. To fight the disease, we have to understand how *Pw* infects plants so efficiently. *Pw* virulence is determined by the production of plant cell wall degrading enzymes (PCWDE) and motility. The production of virulence factors is controlled by complex regulatory systems including KdgR repressor protein, Rsm regulatory system, quorum sensing, different two-component regulatory systems and others.

The aim of this study was to determine how CRP-mediated catabolite repression affects the production of PCWDE. Kõiv *et al.* (2013) proposed that due to increased expression of virulence factors in the *rsmA*<sup>-</sup> and *rsmC*<sup>-</sup> strains, the intracellular energy charge is lower in those strains than in the *wt* strain. Thus, there is more cAMP in the *rsmA*<sup>-</sup> and *rsmC*<sup>-</sup> strains than in the *wt* strain and therefore the transcription of cAMP dependent genes in the *rsmA*<sup>-</sup> and *rsmC*<sup>-</sup> strains is more frequent than in the *wt* strain.

To overcome my unsuccessful construction of a *Pw crp*<sup>-</sup> strain I monitored the production of PCWDE in *wt*, *rsmB*<sup>-</sup> and *rsmC*<sup>-</sup> strains in presence of glucose and cAMP in the medium. My results showed that the production of PCWDE is not affected by CRP-mediated catabolite repression. The addition of glucose to the medium affects the production of PCWDE, and this effect can be either positive or negative. My preliminary results do not confirm the hypothesis proposed by Kõiv *et al.* (2013). On the contrary, they indicate that the intracellular energy charge in the *rsmC*<sup>-</sup> strain is higher than in the *wt* strain. To confirm these results, the experiments should be repeated.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbott, D.W. and Boraston, A. B. (2008). Structural biology of pectin degradation within *Enterobacteriaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)* 72 (2): 301-316.
- Andresen L., Sala E., Kõiv V., Mäe A. (2010). A role for the Rcs phosphorelay in regulating expression of plant cell wall degrading enzymes in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microbiology* 156 (5): 1323-1334.
- Asis Jr., C. A., Shimizu, T., Khan, M. K., Akao, S. (2003). Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Science and Plant Nutrition*. 49 (6): 915-920.
- Atkinson, D. E., Walton, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 242 (13): 3239-3241.
- Barnard, A. M. L., Salmond, G. P. C. (2007). Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 415-423.
- Barras, F., van Gijsegem, F. and Chatterjee, A.K. (1994) Extracellular enzymes and pathogenesis of the soft rot *Erwinia*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 201–234.
- Burton, W. G., Wigginton, M. J. (1970). The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. *Potato Research* 13 (3): 180-186.
- Barras, F., Thurn, K.K. and Chatterjee, A.K. (1987) Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterisation of the enzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 209: 319–325.
- Bartling, S., Wegener, C., Olsen, O. (1995). Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiology* 141: 873-881.
- Chapman, A. G., Fall, L., Atkinson, D. E. (1971). Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* 108 (3): 1072-1086.
- Charkowsky A. O. 2006. The soft rot *Erwinia*. In: Gnanamanickam SS, ed. *Plant-Associated Bacteria*, p. 423–505. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Chatterjee, A., Cui, Y. Y., Chatterjee, A.K. (2009). RsmC of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by

- binding FlhD and modulating transcriptional activity of the master regulator, FlhDC. *J. Bacteriol.* 191: 4582–4593.
- Collmer, A., Keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 383-409.
- Condemine, G., HugouVieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J. (1984). An enzyme of the pectinolytic pathway in *Erwinia chrysanthemi*: 2-keto-3-deoxygluconate oxidoreductase. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2839-2844.
- Condemine, G., HugouVieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J. (1986). Isolation of *Erwinia chrysanthemi kduD* Mutants. *J. Bacteriol.* 165 (3): 937-941.
- Cooper, V.J.; Salmond, G.P. (1993). Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: Evidence for an evolutionary "mix-and-match" of enzyme domains. *Mol. Gen. Genet.* 241: 341–350.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J. M., Sledz, W. (2014). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals. of Applied Biology* Vol. 166 (1): 18–38.
- Czajkowski, R., Pérombelon M. C. M., van Veen J. A., van der Wolf J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60: 999–1013.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Chatterjee, A. K. (2006). *Erwinia carotovora* subspecies produce duplicate species of ExpR, LuxR homologs that activate *rsmA* transcription but differ in their interactions with N-acylhomoserine lactone signals. *J. Bacteriol.* 188: 4715–4726.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., and Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft rotting *Erwinia* spp. *J. Bacteriol.* 177: 5108-5115.
- Cui Y., Chatterjee A., Yang H., Chatterjee A. K. (2008). Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the master regulator

of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA* (*lrhA*) expression. J. Bacteriol. 190: 4610-4623.

Cui, Y., Mukherjee, A., Dumenyo, C. K., Liu, Y., Chatterjee, A. K. (1999). *rsmC* of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and hairpin<sub>Ecc</sub> production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA-binding protein (RsmA). J. Bacteriol. 181 (19): 6042–6052.

Ebright, R. H., Ebright, Y. W., Gunasekera, A. (1989). Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli lac* DNA site. Nucleic Acids Res. 17 (24): 10295–10305.

Ebright, R. H. (1993). Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. Molecular Microbiology 8 (5): 797-802.

Frolova, J., (2012) Magistritöö. Plasmiidsete vektorsüsteemide konstrueerimine ja rakendamise Rsm süsteemi mõju uurimiseks taimepatogeenis *Pectobacterium carotovorum* alam. *Carotovorum*.

Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L., Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. J Bacteriol. 192 (14): 3553-64.

Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 381-391.

Goto, M., Matsumoto, K. (1987). *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. Isolated from Diseased Rhizomes and Fibrous Roots of Japanese Horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.). International Journal of Systematic Bacteriology 37 (2): 130-135

Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M.-B., Eriksson, A., Mäe, A., Kõiv, V., Palva, E. T. (1994). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 207-217.

- Heilbronn, J., Lyon, G. D. (1990). The ineffectuality of potato protease inhibitor on the extracellular protease from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Appl. Bacteriol. 69: 25-29.
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J. (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 21 (3): 384-97.
- Hubbard, J. P., Williams, J. D., Niles, R. M., Mount, M. S. (1978). The relation between glucose repression of endopolygalacturonate trans-eliminase and adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in *Erwinia carotovora*. Phytopathology 68: 95-99.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M., Palva, E. T. (2001). Global Regulators ExpA (GacA) and KdgR Modulate Extracellular Enzyme Gene Expression Through the RsmA-*rsmB* System in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. MPMI 14 (8): 931-938.
- Katz, L., Englesberg, E. (1971). Hyperinducibility as a Result of Mutation in Structural Genes and Self-Catabolite Repression in the *ara* Operon. J. Bacteriol. 107 (1): 34-52.
- Kyöstiö, S. R., Cramer, C. L., Lacy, G. H. (1991). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene. J. Bacteriol. 173 (20): 6537-46.
- Kõiv V., Andresen L., Broberg M., Frolova J., Somervuo P., Auvinen P., Pirhonen M., Tenson T., Mäe A. (2013). Lack of RsmA-Mediated Control Results in Constant Hypervirulence, Cell Elongation, and Hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. PLOS ONE. 8 (1): 1-12.
- Kõiv, V., Andresen, L., Mäe, A. (2010). AepA of *Pectobacterium* is not involved in the regulation of extracellular plant cell wall degrading enzymes production. Molecular Genetics and Genomics 283: 541-549.
- Liu, Y., Jiang, G., Mukherjee, A., Ma, W. L., Chatterjee, A. K. (1999). *kdgR<sub>Ecc</sub>* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin<sub>Ecc</sub>, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Bacteriol. 181: 2411-2421.
- Livingston III, D. P., Henson, C. A. (1998). Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. Plant Physiol. 116 (1): 403-408.

- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., *et al.* (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97 (9): 1150-1163.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* 13 (5): 236–242.
- Makman, R. S., Sutherland, E. W. (1965). Adenosine 3'5'-Phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 240 (3): 1309.
- Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J., Seymour, G. B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53 (377): 2115-2119.
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E., Mäe, A. (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology* 145: 1959–1966
- Martinez-Antonio, A., Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (5): 482–489.
- McMillan, G.P., Barrett, A.M. and Pérombelon, M.C.M. (1994) An isoelectric focusing study of the effect of methyl-esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot *Erwinia* spp. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 175–184.
- Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199
- Moleleki, L. N., Onkendi, E. M., Mongae, A., Kubheka, G. C. (2013). Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 135: 279-288.
- Moran, F., Starr, M. P. (1969). Metabolic Regulation of Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase in *Erwinia*. *European J. Biochem.* 11: 291-295.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A., Chatterjee, A. K. (1998). RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* 180: 3629–3634.



- Mäe, A., Heikinheimo, R., and Palva, E. T. (1995). Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celVI* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* 247: 17–26
- Nasser, W., Reverchon, S., Robert-Baudouy, J. (1992). Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Microbiology* 6 (2): 257-265.
- Nealson, K. H., Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43: 496–518.
- Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent. *J Bacteriol.* 104 (1): 313-322.
- Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T., Ebright, R. H. (1996). Transcription Activation at Class II CAP-Dependent Promoters: Two Interactions between CAP and RNA Polymerase. *Cell* 97: 1123-1134.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal.* 12 (6): 2467-2476.
- Pirhonen M., Heino P., Helander I., Harju P., Palva E. T. (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb. Pathogenesis* 4: 359-367.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.-B. ja Palva, E. T. (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carototwra* subspecies *carotoilora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 276-283.
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51: 1–12.
- Pérombelon M. C. M., Kelman A. (1980). Ecology of the soft rot Erwinias. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 18: 361-387.
- Pérombelon, M. C. M., Kelman, A. (1987). Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: a proposal for a revision of the terminology. *Plant Disease* 71: 283–285.

- Pérombelon, M. C. M., Salmond, G. P. C. (1995). Bacterial soft rots. In: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Vol. 1. Prokaryotes (Singh, U.S., Singh, R.P. and Kohmoto, K., eds), pp. 1–20. Oxford, UK: Pergamon.
- Potrykus, K., Cashel M. (2008). (p)ppGpp: still magical? Annual review of microbiology 62: 35-51.
- Reznikoff, W. S. (1992). Catabolite gene activator protein activation of *lac* transcription. J. Bacteriol. 174: 655-658.
- Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J., Nasser, W. (1997). The Cyclic AMP Receptor Protein Is the Main Activator of Pectinolysis Genes in *Erwinia chrysanthemi*. Journal of Bacteriology. 179 (11): 3500-3508.
- Reverchon, S., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. (1991). Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. Molecular Microbiology. 5 (9): 2203-2216.
- Rico, A., Preston, G. M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. Mol. Plant Microbe Interact. 21 (2): 269-82.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. J. Bacteriol. 175: 4744–4755.
- Saarilahti, H.T., Henirssat, B., Palva, E.T. (1990). CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Gene 90: 9–14.
- Sabnis, N. A., Yang, H., Romeo, T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. J. Biol. Chem. 270 (49): 29096-29104.
- Salmond, G. P. C., (1994). Secretion of Extracellular Virulence Factors by Plant Pathogenic Bacteria. Annual Review of Phytopathology 32: 181-200.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schultz, S. C., Shields, G. C., Steitz, T. A. (1991). Crystal Structure of a CAP-DNA Complex: The DNA Is Bent by 90°. *Science* 253 (5023): 1001-1007.
- Sjöblom, S., Brader, G., Koch, G., Palva, T. E. (2006). Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Microbiol.* 60: 1474–1489.
- Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs, P. V. Jr., West, S. E. (2002). Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 148 (5): 1561-1569.
- Svitil, A. L., Cashel, M., Zyskind, J. W. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268 (4): 2307-2311.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., Birch, P. R. J. (2003). Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4 (1): 17-30.
- Tsuyumu, S. (1979). „Self-catabolite repression“ of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* 137 (2): 1035-1036.
- Valverde, C., Lindell, M., Gerhart, E., Wagner, H., Haas, D. (2004). A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* 279: 25066–25074.
- Zhang L., Murphy P. J., Kerr, A., Tate, M. E. (1993). *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 362: 446-448.
- Walker, D., Reeves, P. J., and Salmond, G. P. C. (1994). The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important virulence factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 425-431.
- Wei, B., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Pruss, B. M., Babitzke, P., Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40: 245–256.
- Whitaker, D. 1971: Cellulases, *The Enzymes Vol. 5*, P. Boyer, Academic Press, NY, 273.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, H. J., Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Winslow, C.-E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., Smith, G. H. (1920). The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *Journal of Bacteriology.* 5 (3): 191–229.

Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M. *et al.* (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 92: 9427-9431.

## LIHTLITSENTS

Mina, Sirli Luup (15.04.1993),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

### **Kataboliitne repressioon *Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 virulentsuses**

mille juhendajad on Lee Põllumaa ja Andres Mäe

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015